

INPI

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

10 SEP 2003

07 JAN 2005

16 SEP. 2003

REC'D 06 OCT 2003

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

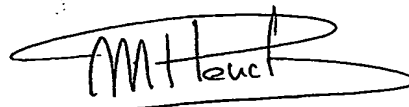
Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 SEP. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVE D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2


Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 540 W / 250899

REMARQUE DES PIÈCES DATE 09 JUIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0208613 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 09 JUL. 2002		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet NONY & ASSOCIÉS 3 Rue de Penthièvre 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) OA02201/S819/BR73165/CR/PL/klp			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date <input type="text"/>
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
Demande de brevet initiale		N°	Date <input type="text"/>
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouvelle protéase aspartique dite SASPase et son utilisation dans le domaine cosmétique et thérapeutique.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		L'OREAL	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme à Conseil d'Administration	
N° SIREN		6 . 3 . 2 . 0 . 1 . 2 . 1 . 0 . 0	
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	14 rue Royale	
	Code postal et ville	75008	PARIS
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 09 JUIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0208613 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 260899
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		OA02201/S819/BR73165/CR/PLC/klp	
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		NONY & ASSOCIES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	3 Rue de Penthièvre	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.43.12.84.60	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.43.12.84.70	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		nony@nony.fr	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Jean-Claude TONNELIER 92 1241		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La présente invention a pour objet principal l'utilisation, dans les domaines cosmétique et thérapeutique, d'une nouvelle protéase à acide aspartique dite SASPase, des formes tronquées ou dérivées de ladite protéine ou d'un mélange de polypeptides issu de sa protéolyse notamment en vue de traiter les troubles liés à un dysfonctionnement de la prolifération et/ou différenciation cellulaire.

L'invention a également pour objet des séquences d'acide désoxyribonucléique codant ladite protéase à acide aspartique SASPase et sa forme dite activée, les séquences polypeptidiques correspondantes et les utilisations desdites séquences désoxyribonucléiques.

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques capables de couper des liaisons peptidiques. Un certain nombre d'entre elles sont aujourd'hui connues comme jouant un rôle essentiel au niveau de l'équilibre et de la physiologie de l'épiderme.

L'épiderme est conventionnellement divisé en une couche basale de kératinocytes constituant la couche germinative de l'épiderme, une couche dite épineuse constituée de plusieurs couches de cellules polyédriques disposées sur les couches germinatives, une à trois couches dites granuleuses constituées de cellules aplaties contenant des inclusions cytoplasmiques distinctes, les grains de kératohyaline et enfin, un ensemble de couches supérieures appelées couches cornées (ou *stratum corneum*), constituée de kératinocytes au stade terminal de leur différenciation appelés cornéocytes.

Les cornéocytes sont des cellules anucléées principalement constituées d'une matière fibreuse contenant des cytokératines, entourée d'une enveloppe cornée. Il y a en permanence production de nouveaux kératinocytes pour compenser la perte en continu de cellules épidermiques au niveau de la couche cornée selon un mécanisme dénommé desquamation. Un déséquilibre entre la production des cellules au niveau de la couche basale et le taux de desquamation peut notamment conduire à des formations d'écailles à la surface de la peau.

En l'occurrence, de nombreuses pathologies cutanées se caractérisent par la production d'une couche cornée épaissie et par une desquamation anormale, c'est-à-dire par une hyperkératose. A titre d'exemple, on peut citer :

- la xérose (ou sécheresse cutanée),
- les ichthyoses,
- le psoriasis,

- certaines lésions tumorales bénignes ou malignes, et
- les hyperkératoses réactionnelles.

A l'inverse, certaines manifestations pathologiques entraînent un amincissement de l'épiderme et plus particulièrement de la couche cornée. Ce type de manifestations se traduit alors par une fragilité excessive du revêtement cutané. A titre représentatif de ces troubles, on peut notamment citer les réactions d'origine immunitaire généralement induites par mise en présence ou contact avec un ou plusieurs agents exogènes.

En conséquence, la connaissance des polypeptides impliqués dans la cohésion inter cornéocytaire est une des voies qui peut permettre l'élaboration de produits destinés à lutter contre les effets d'un excès ou d'un défaut en polypeptide(s) de ce type, en particulier à la surface de la peau.

L'un des objets de l'invention est précisément de proposer l'utilisation dans un but cosmétique et/ou thérapeutique d'un polypeptide impliqué dans la régulation du phénomène de différenciation/prolifération épidermique.

Plus précisément, les inventeurs ont mis en évidence dans des kératinocytes humains, isolé et purifié un polypeptide possédant dans sa séquence peptidique la séquence FLVDSGAQVSVV (SEQ ID NO : 1) correspondant aux sites actifs des protéases de la famille des protéases dites à acide aspartique.

Ce polypeptide encore dénommé ci-après protéine SASPase, est par ailleurs caractérisé par la présence dans sa séquence peptidique des séquences suivantes :

- AQFLVANASAEAAIGTDVLQ (SEQ ID NO : 2) et
- ILGVWDTAV (SEQ ID NO : 3).

Un premier aspect de l'invention concerne donc un polypeptide isolé et purifié, appartenant à la famille des protéases à acide aspartique caractérisé en ce qu'il possède une séquence peptidique représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 et ses variants.

De manière inattendue les inventeurs ont mis en évidence que la protéine représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, encore appelée protéine SASPase, possédait une activité protéolytique significative et ont notamment constaté cette activité vis-à-vis de la caséine et de l'insuline comme le montre les exemples ci-après.

En particulier, l'invention concerne un polypeptide dont la séquence peptidique

est représentée par la SEQ ID NO : 5.

Ils ont par ailleurs observé que cette protéine SASPase était autocatalytique et générait à un pH compris entre 3 et 7, et de préférence supérieur ou égal à 4,5 une forme tronquée dite « SASPase activée », correspondant à la séquence SEQ ID NO : 6 capable à son tour de se dimériser.

La présente invention a également pour objet un polypeptide isolé et purifié, caractérisé en ce que sa séquence peptidique est représentée par la SEQ ID NO : 6.

La présente invention a également pour objet un polypeptide isolé et purifié, caractérisé en ce que sa séquence peptidique est représentée par la SEQ ID NO : 16 qui correspond à la séquence SEQ ID NO : 6 déletée de ces deux premiers acides aminés.

D'une façon générale, on entend par homologue d'un polypeptide ou d'une séquence peptidique, tout polypeptide ou toute séquence peptidique ayant une homologie de séquence d'au moins 85 %, notamment d'au moins 90 % et en particulier d'au moins 95 % et ayant le cas échéant le même type d'activité biologique que ledit polypeptide ou que ladite séquence peptidique. D'une façon générale, l'invention s'étend à toutes les formes homologues des différents polypeptides ou séquences peptidiques cités. Ces formes homologues englobent les variants définis ci-après.

L'invention s'étend en particulier aux formes homologues des polypeptides cités précédemment, c'est-à-dire manifestant la même activité biologique et possédant au moins 85 %, notamment au moins 90 % et en particulier au moins 95 % d'homologie de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

De même, l'invention s'étend aux protéines possédant au moins une homologie de 30 % avec la séquence de SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 à la condition que l'homologie avec la séquence du site actif SEQ ID NO : 1 contenue dans les SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 soit d'au moins 80 %.

L'invention s'étend également aux protéines possédant à la fois le motif "aspartyl protease retroviral type" défini sous la référence de motif PROSITE : PS50175 ainsi qu'au moins un domaine transmembranaire tel que prédit par les algorithmes reconnus pour une telle détection parmi lesquels on peut citer: PRED-TMR2, TMHMM, TMpred et SOSUI.

Les variations considérées selon l'invention peuvent dériver, soit de la délétion d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou

SEQ ID NO : 16, ou de l'addition d'un ou plusieurs acides aminés à la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16, soit encore de la substitution d'un ou plusieurs acides aminés à la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16. Les séquences correspondantes sont encore désignées sous le terme de variants dans le

5 cadre de la présente invention.

A titre illustratif des variants de délétion on peut plus particulièrement citer les séquences peptidiques suivantes :

La séquence SEQ ID NO : 4 correspondant à la SEQ ID NO : 5 tronquée de son fragment N-terminal Δ 1- 84.

10 La séquence SEQ ID NO : 7 correspondant à la séquence codant pour la partie N-terminale de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5). L'interaction de ce fragment avec un ligand biologique pourrait être une étape importante pour l'activation de la protéine SASPase et notamment la génération de sa forme activée (SEQ ID NO : 6).

La séquence SEQ ID NO : 8 correspondant à la séquence codant pour la partie

15 dite transmembranaire de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

La séquence SEQ ID NO : 9 correspondant à la séquence codant pour un peptide issu de la partie C-terminale de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

Sont également couverts sous le terme de variant, les protéines de fusion de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5), de sa forme activée (SEQ ID NO : 6) ou de sa forme

20 représentée en séquence (SEQ ID NO : 16) avec un autre polypeptide, un agent de ciblage hydrophile ou hydrophobe ou un précurseur de bioconversion susceptible notamment de contrôler l'activation de ladite protéine.

Il est connu que les polypeptides peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la formation de liaisons disulfures, les clivages protéolytiques

25 spécifiques, l'addition de glucides (glycosylation), la phosphorylation en particulier au niveau des sérines et/ou des thréonines et/ou des tyrosines, et/ou l'association à des lipides.

Le polypeptide de l'invention peut avoir subi une ou plusieurs modifications post-traductionnelles. En particulier, les polypeptides selon l'invention peuvent être N-glycosylés, phosphorylés, myristoylés, amidés et/ou citrullinés.

30 Ainsi, l'invention concerne également les polypeptides revendiqués ayant subi ou non des modifications post-traductionnelles.

L'invention s'étend également aux formes multimères et de préférence à la

SEQ ID NO : 16, ou de l'addition d'un ou plusieurs acides aminés à la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16, soit encore de la substitution d'un ou plusieurs acides aminés à la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16. Les séquences correspondantes sont encore désignées sous le terme de variants dans le cadre de la présente invention.

A titre illustratif des variants de délétion on peut plus particulièrement citer les séquences peptidiques suivantes :

La séquence SEQ ID NO : 4 correspondant à la SEQ ID NO : 5 tronquée de son fragment N-terminal $\Delta 1-84$.

La séquence SEQ ID NO : 7 correspondant à la séquence de la partie N-terminale de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5). L'interaction de ce fragment avec un ligand biologique pourrait être une étape importante pour l'activation de la protéine SASPase et notamment la génération de sa forme activée (SEQ ID NO : 6).

La séquence SEQ ID NO : 8 correspondant à la séquence de la partie dite transmembranaire de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

La séquence SEQ ID NO : 9 correspondant à la séquence d'un peptide issu de la partie C-terminale de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

Sont également couverts sous le terme de variant, les protéines de fusion de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5), de sa forme activée (SEQ ID NO : 6) ou de sa forme représentée en séquence (SEQ ID NO : 16) avec un autre polypeptide, un agent de ciblage hydrophile ou hydrophobe ou un précurseur de bioconversion susceptible notamment de contrôler l'activation de ladite protéine.

Il est connu que les polypeptides peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la formation de liaisons disulfures, les clivages protéolytiques spécifiques, l'addition de glucides (glycosylation), la phosphorylation en particulier au niveau des sérines et/ou des thréonines et/ou des tyrosines, et/ou l'association à des lipides.

Le polypeptide de l'invention peut avoir subi une ou plusieurs modifications post-traductionnelles. En particulier, les polypeptides selon l'invention peuvent être N-glycosylés, phosphorylés, myristoylés, amidés et/ou citrullinés.

Ainsi, l'invention concerne également les polypeptides revendiqués ayant subi ou non des modifications post-traductionnelles.

L'invention s'étend également aux formes multimères et de préférence à la

SEQ ID NO : 16, ou de l'addition d'un ou plusieurs acides aminés à la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16, soit encore de la substitution d'un ou plusieurs acides aminés à la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16. Les séquences correspondantes sont encore désignées sous le terme de variants dans le

5 cadre de la présente invention.

A titre illustratif des variants de délétion on peut plus particulièrement citer les séquences peptidiques suivantes :

La séquence SEQ ID NO : 4 correspondant à la SEQ ID NO : 5 tronquée de son fragment N-terminal Δ 1-84.

10 La séquence SEQ ID NO : 7 correspondant à la séquence de la partie N-terminale de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5). L'interaction de ce fragment avec un ligand biologique pourrait être une étape importante pour l'activation de la protéine SASPase et notamment la génération de sa forme activée (SEQ ID NO : 6).

La séquence SEQ ID NO : 8 correspondant à la séquence de la partie dite

15 transmembranaire de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

La séquence SEQ ID NO : 9 correspondant à la séquence d'un peptide issu de la partie C-terminale de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

Sont également couverts sous le terme de variant, les protéines de fusion de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5), de sa forme activée (SEQ ID NO : 6) ou de sa forme

20 représentée en séquence (SEQ ID NO : 16) avec un autre polypeptide, un agent de ciblage hydrophile ou hydrophobe ou un précurseur de bioconversion susceptible notamment de contrôler l'activation de ladite protéine.

Il est connu que les polypeptides peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la formation de liaisons disulfures, les clivages protéolytiques

25 spécifiques, l'addition de glucides (glycosylation), la phosphorylation en particulier au niveau des sérines et/ou des thréonines et/ou des tyrosines, et/ou l'association à des lipides.

Le polypeptide de l'invention peut avoir subi une ou plusieurs modifications post-traductionnelles. En particulier, les polypeptides selon l'invention peuvent être N-glycosylés, phosphorylés, myristoylés, amidés et/ou citrullinés.

30 Ainsi, l'invention concerne également les polypeptides revendiqués ayant subi ou non des modifications post-traductionnelles.

L'invention s'étend également aux formes multimères et de préférence à la

forme dimère de la séquence peptidique SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16. La forme dimère de la séquence peptidique SEQ ID NO : 6 est en particulier caractérisée en exemple V ci-après. Elle peut notamment être obtenue par association moléculaire de la forme monomérique ou par expression de son ADNc codant pour le dimère actif.

Les polypeptides revendiqués peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Par synthétique, on entend ici tout polypeptide obtenu chimiquement ou par production dans un organisme après introduction dans cet organisme des éléments nécessaires à cette production.

Ils peuvent être issus de toute origine possible à savoir soit animale, en particulier de mammifères et encore plus particulièrement humaine, soit végétale, soit de micro-organismes (par exemple virus, phages, bactéries, levures entre autres) ou encore de champignons, ou issu d'une surexpression dans un système eucaryote, par exemple une cellule de mammifère, sans préjuger du fait qu'ils soient présents de manière naturelle ou non dans ledit organisme d'origine.

Préférentiellement, les polypeptides conformes à l'invention sont d'origine naturelle, purifiés à partir de tissus de mammifères, plus particulièrement à partir de peau de mammifères.

En particulier, ils sont purifiés à partir de peau humaine et encore plus particulièrement à partir d'épiderme humain.

On sait que dans un polypeptide, un ou plusieurs résidus d'acide aminé peuvent être remplacés par des résidus d'acide aminé ayant un indice hydrophatique similaire sans pour autant changer les propriétés biologiques du polypeptide.

L'indice hydrophatique est un indice attribué aux acides aminés en fonction de leur hydrophobicité et de leur charge (Kyte *et al.* (1982), J. Mol. Biol., 157 : 105).

Ainsi l'invention a également pour objet un polypeptide tel que décrit ci-dessus dans lequel un résidu d'acide aminé au moins a été remplacé par un résidu d'acide aminé ayant un indice hydrophatique similaire.

On peut également classer les polypeptides en fonction de leur point isoélectrique.

Le point isoélectrique théorique d'un polypeptide peut être déduit de son enchaînement en acides aminés. Les polypeptides de l'invention sont théoriquement des

polypeptides acides.

Ainsi les polypeptides de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 possèdent un point isoélectrique compris entre 3 et 9, plus particulièrement entre 4 et 6 et notamment d'environ 5,8.

5 On sait en outre que la séquence primaire en acides aminés ainsi que les diverses modifications post-traductionnelles subies par un polypeptide font que ledit polypeptide peut être caractérisé par sa masse moléculaire apparente exprimée en kilodaltons.

10 On entend par masse moléculaire apparente, la masse moléculaire obtenue pour le polypeptide par comparaison de la mobilité électrophorétique de celui-ci avec celles de protéines standards de poids moléculaires connus sur gel de polyacrylamide/sodium dodécylsulfate, ou encore par comparaison du volume d'élution du polypeptide avec celui de protéines standard de poids moléculaires connus en chromatographie d'exclusion (selon les techniques décrites dans « Protein Purification », J-C. Janson et L. Ryden, VCH
15 Publisher Inc. N.Y., 1989). (La méthode retenue dans le cadre de l'invention est celle reposant sur la mobilité électrophorétique).

La connaissance de l'enchaînement en acides aminés du polypeptide de l'invention permet d'en déterminer le poids moléculaire théorique.

20 L'invention concerne donc un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 6 ayant une masse moléculaire apparente comprise entre 5 et 30 kilodaltons (kD), notamment entre 9 et 15 kD, et plus particulièrement entre 11 et 14 kD. En particulier, ce polypeptide de l'invention a une masse moléculaire apparente de l'ordre de 12kD.

Elle vise également un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5 ayant une masse moléculaire apparente comprise entre 30 et 40 kD, particulièrement entre 32 et
25 39 kD et notamment entre 35 et 38 kD. En particulier, ce polypeptide de l'invention, a une masse moléculaire apparente de l'ordre de 37 kD.

Comme il ressort des exemples présentés ci-après, les inventeurs ont caractérisé l'expression du polypeptide dont la séquence est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5 dans un grand nombre de tissus biologiques humains tel que le foie foetal,
30 le placenta, le muscle, le poumon, l'intestin grêle et surtout au niveau du cerveau et du cœur et plus particulièrement au niveau de l'épiderme où l'expression est particulièrement élevée.

Il a par ailleurs été constaté que la SASPase de séquence SEQ ID NO : 5 dégradait la cornéodesmosine, qui est un marqueur de la desquamation.

Enfin, la présence, dans la séquence polypeptidique de la SASPase (SEQ ID NO : 5) d'un site autocatalytique correspondant à un site décrit pour la protéase de type matrilysine capable d'activer les MMP de type 1, 2, et 9, témoigne d'une activité potentielle de la SASPase, ainsi que de ses formes (SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16) ou de ses fragments, sur des substrats endogènes et donc d'applications potentielles en cicatrisation, ré-épithialisation, vieillissement, angiogénèse et cancérisation (processus d'invasion) pour ladite protéine.

L'ensemble de ces informations, valide donc l'implication du polypeptide conforme à l'invention dans le processus de prolifération et/ou différenciation cellulaire et identifie celui-ci en tant que nouvelle cible dermato/cosmétologique et thérapeutique.

En conséquence, un second aspect de l'invention concerne une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide naturel ou synthétique purifié dont la séquence comprend au moins une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16.

En particulier, la présente invention concerne une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide naturel ou synthétique purifié dont la séquence est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 et de préférence qui est représentée par la séquence peptidique SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

La présente invention concerne également une composition comprenant au moins un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16, sous une forme multimère et de préférence dimère.

Au sens de l'invention, et sans indication contraire, on entend couvrir sous le terme polypeptide dans les compositions revendiquées les polypeptides naturels ou synthétiques, qu'il soit obtenu par protéolyse ou par synthèse, les différentes formes post-traductionnelles de ceux-ci et notamment celles décrites précédemment ou encore tout polypeptide naturel ou synthétique dont la séquence est totalement ou partiellement constituée par les séquences précitées comme par exemple les variants décrits ci-dessus.

Il est par ailleurs connu que la séquence primaire en acides aminés d'un

polypeptide détermine des sites spécifiquement reconnus par les protéases qui, une fois la reconnaissance de ces sites effective vont, avec ou sans fixation audit polypeptide, induire son clivage par protéolyse.

En conséquence, l'invention vise également une composition comprenant au moins un mélange de polypeptides issus de la protéolyse d'un polypeptide dont la séquence est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 et plus particulièrement, dont la séquence est représentée par la SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

La quantité de polypeptide contenue dans les compositions de l'invention est, bien entendu, fonction de l'effet recherché et peut donc varier dans une large mesure.

Pour donner un ordre de grandeur, la composition peut contenir un polypeptide conforme à l'invention en une quantité représentant de 0,00001 % à 50 % du poids total de la composition et préférentiellement en une quantité représentant de 0,001 % à 10 % du poids total de la composition et encore plus préférentiellement en une quantité représentant de 0,1 % à 1 % du poids total de la composition.

Comme décrit précédemment, un certain nombre de désordres sont associés à des troubles de différenciation et/ou prolifération cellulaire. Dans la mesure où les polypeptides conformes à l'invention sont impliqués au niveau de la régulation de ces deux phénomènes, ils constituent avantageusement des cibles potentielles pour traiter tout désordre résultant d'un dysfonctionnement de la prolifération ou de la différenciation cellulaires en particulier épidermiques. En conséquence, outre le fait que les polypeptides selon l'invention peuvent être utilisés directement à titre de matière active dans une composition cosmétique ou pharmaceutique, ils peuvent également eux-mêmes servir de cible dans un traitement cosmétique ou pharmaceutique ou être utilisés à titre d'outils de diagnostic.

En l'occurrence, la présente invention concerne également l'utilisation d'un composé chimique ou biologique pour la préparation d'une composition destinée à interagir avec un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et plus particulièrement avec un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou d'en moduler l'activité biologique.

Ce composé biologique peut notamment être une protéase présentant un site spécifique de reconnaissance et/ou de fixation et de coupure au sein de la séquence d'acides aminés dudit polypeptide et de préférence d'un polypeptide ayant comme séquence primaire la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

5 Il peut également s'agir d'un anticorps spécifique dudit polypeptide.

En l'occurrence, il a été montré que des inhibiteurs de protéases de type rétropepsines manifestaient également un effet vis-à-vis de l'activité de la protéine SASPase. A titre illustratif des inhibiteurs pouvant être utilisés selon l'invention, on peut notamment citer les inhibiteurs de rétropepsines, notamment commercialisés par Bachem.

10 Cet inhibiteur peut également être sélectionné pour interférer sur la dimérisation de la SASPase (SEQ ID NO : 5) ou de sa forme activée représentée en séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16, préalablement à son activité protéolytique. Cet inhibiteur peut également être un inhibiteur endogène capable d'inhiber spécifiquement la SASPase ou son autoactivation.

15 De même, ce composé biologique peut être un activateur. A titre représentatif de ceux-ci on peut notamment citer le modulateur de rétropepsine RP3 caractérisé en exemple VIII ci-après.

De même, la présente invention s'étend à l'utilisation d'un composé biologique ou chimique pour la préparation d'une composition destinée à inhiber la dimérisation du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

20 Les compositions revendiquées et considérées selon l'invention peuvent être des compositions pharmaceutiques ou cosmétiques. Plus précisément, elles peuvent être utilisées dans les domaines cosmétique, dermatologique, dermato-cosmétique et pharmacologique.

25 Un milieu physiologiquement acceptable est selon l'invention un milieu cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable compatible avec la peau, les muqueuses, les ongles et/ou les cheveux.

Les compositions selon l'invention peuvent être appliquées sur les ongles, les cheveux et plus particulièrement sur la peau et les muqueuses.

30 Elles sont particulièrement avantageuses pour agir sur un ou plusieurs mécanismes épidermiques tels que la dégradation de protéine(s), l'activation d'enzyme(s), et/ou la régulation du phénomène de différenciation/prolifération épidermique.

En l'occurrence, les compositions selon l'invention sont particulièrement utiles pour suppléer à un déséquilibre de la différenciation/prolifération épidermique. Plus particulièrement, elles peuvent être utiles pour réguler les phénomènes d'hydratation, d'inflammation, de mélanogénèse, et/ou de desquamation, le phénomène de vieillissement, les mécanismes de défense, pour la régulation de la différenciation/prolifération sur certains types cellulaires et cutanés : kératinocytes, mélanocytes, cellules de Langerhans, sébocytes, adipocytes, ainsi que la régulation des phénomènes de sécrétion et de processus d'invasion.

D'une manière plus précise, les compositions revendiquées s'avèrent intéressantes dans les domaines suivants :

- pour traiter les affections dermatologiques liées à un désordre de la kératinisation portant sur la différenciation et sur la prolifération notamment pour traiter les acnés vulgaires, comédoniennes, polymorphes, rosacées, les acnés nodulokystiques, conglobata, les acnés séniles, les acnés secondaires telles que l'acné solaire, médicamenteuse ou professionnelle,

- pour traiter d'autres types de troubles de la kératinisation, notamment les ichtyoses, les état ichtyosiformes, la maladie de Darrier, les dératodermies palmoplantaires, les leucoplasies et les états leucoplasiformes, le lichen cutané ou muqueux (buccal),

- pour traiter d'autres affections dermatologiques liées à un trouble de la kératinisation avec une composante inflammatoire et/ou immuno-allergique et notamment toutes les formes de psoriasis qu'il soit cutané, muqueux ou unguéal, et même le rhumatisme psoriatique, ou encore l'atopie cutanée telle que l'eczéma, ou l'urticaire ou encore l'hypertrophie gingivale ; les composés peuvent également être utilisés dans certaines affections inflammatoires ne présentant pas de trouble de la kératinisation,

- pour traiter toutes les proliférations dermiques ou épidermiques qu'elles soient bénignes ou malignes, qu'elles soient ou non d'origine virale telles que verrues vulgaires, les verrues planes et l'épidermodysplasie verruciforme, les papillomatoses orales ou florides et les proliférations pouvant être induites par les ultra-violets notamment dans le cas des épithélioma baso- et spino-cellulaires,

- pour traiter d'autres désordres dermatologiques tels que les dermatoses bulleuses et les maladies du collagène,

- pour réparer ou lutter contre le vieillissement de la peau, qu'il soit photoinduit ou chronologique ou pour réduire les pigmentations et les kératoses actiniques, ou toutes pathologies associées au vieillissement chronologique ou actinique,
- pour prévenir ou guérir les stigmates de l'atrophie épidermique et/ou dermique induite par les corticostéroïdes locaux ou systémiques, ou toute autre forme d'atrophie cutanée,
- pour prévenir ou traiter les troubles de la cicatrisation ou pour prévenir ou pour réparer les vergetures, et
- pour lutter contre les troubles de la fonction sébacée tels que l'hyperséborrhée de l'acné ou la séborrhée simple.

Dans le cas d'une application dans le domaine cosmétique, en particulier pour l'hygiène corporelle et capillaire, les compositions selon l'invention sont notamment utiles pour le traitement des peaux à tendance acnéique, pour la repousse des cheveux, l'anti-chute, pour lutter contre l'aspect gras de la peau ou des cheveux, dans la protection contre les aspects néfastes du soleil ou dans le traitement des peaux physiologiquement sèches, pour prévenir et/ou pour lutter contre le vieillissement photoinduit ou chronologique. Elles peuvent également être utiles pour améliorer les peaux reconstruites. On peut également utiliser directement dans le milieu de culture le polypeptide et/ou ses dérivés et/ou des modulateurs de son activité ou de son activation.

Un autre objet de l'invention est un procédé de traitement cosmétique destiné à lutter contre les troubles cutanés liés à un dysfonctionnement de la prolifération et/ou la différenciation cellulaire comme notamment les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, les troubles de sébogénèse, les néoplasies et/ou les signes de vieillissement cutané caractérisé en ce que l'on applique sur la peau, les muqueuses et/ou les fibres kératiniques une composition cosmétique comprenant au moins un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16, en particulier qui est représenté en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16, et plus particulièrement qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

Le procédé de traitement de l'invention est un procédé cosmétique destiné à

améliorer l'aspect esthétique de l'individu subissant des troubles de la prolifération et/ou de la différenciation épidermique.

L'invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi les SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et notamment qui est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16, et plus particulièrement qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou d'un mélange issu de la protéolyse de l'un de ces polypeptides pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des affections dermatologiques et notamment celles citées précédemment.

En particulier, l'invention concerne l'utilisation d'un polypeptide ou d'un mélange tel que décrit précédemment pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à traiter l'ichtyose, le psoriasis ou toute pathologie impliquant une hyperkératose, une parakératose ou ayant une composante inflammatoire. Il peut également s'agir de compositions anti-douleur, de compositions pour traiter certaines maladies de la peau comme l'eczéma, la rosacée, le psoriasis, les lichens, les prurits sévères.

Dans la mesure où les polypeptides de séquences SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 possèdent des homologies de structure importantes avec les protéines rétrovirales, comme il est montré dans les exemples et en figure 4, et notamment avec celles du virus de l'immunodéficience humaine, ils sont également susceptibles de se comporter comme des agents capables de moduler l'infection virale ou d'être modulés par certaines antiprotéases virales.

En conséquence, la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16, notamment est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16, et plus particulièrement qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 pour la préparation d'une composition antivirale.

Ces compositions peuvent notamment être utiles pour traiter des pathologies

épidermiques, associées à un virus de type papillomavirus tel que HERPES ou HIV.

Le traitement implique généralement une application sur la peau du sujet à traiter de la composition telle que décrite précédemment.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une séquence
5 peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 à titre d'outil de diagnostic ou de criblage.

Plus précisément, l'invention vise l'utilisation d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5,
10 SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et plus particulièrement d'un polypeptide qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer ou purifier, éventuellement à partir d'épiderme, toute molécule, susceptible de moduler son interaction avec d'éventuels
15 ligands.

En outre, l'invention vise l'utilisation d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et plus particulièrement d'un polypeptide qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6
20 ou SEQ ID NO : 16 ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour sélectionner de nouvelles molécules antivirales présentant moins d'effets secondaires.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et plus particulièrement d'un polypeptide qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer des antisérums et/ou des anticorps
25 monoclonaux spécifiques, visant notamment à purifier ces protéines et leurs fragments ou à moduler leur activité.
30

Par extension, l'invention a également pour objet toute utilisation de ladite séquence pour produire des anticorps ou fragments d'anticorps recombinants, quel que soit

le système biologique utilisé pour produire ces derniers.

L'invention a encore pour objet un anticorps poly- ou mono-clonal caractérisé par le fait qu'il reconnaît spécifiquement un polypeptide dont la séquence peptidique est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou
5 SEQ ID NO : 16, et plus particulièrement qui est constituée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

L'invention vise également l'utilisation de cet anticorps pour le diagnostic d'une déficience ou d'une surexpression de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

Elle concerne également l'utilisation d'un anticorps bloquant l'activité et/ou
10 l'activation de la SASPase dans le traitement de pathologies caractérisées par une surexpression et/ou une activité exagérée de la SASPase.

L'anticorps peut être un anticorps préparé par immunisation de toute espèce animale utilisable à cette fin, particulièrement le lapin. L'anticorps peut être préparé par immunisation à l'aide d'un polypeptide de l'invention que celui-ci soit d'origine naturelle
15 ou synthétique ou recombinante de préférence purifié.

On sait qu'une protéine est synthétisée dans les cellules à partir d'une matrice d'acide désoxyribonucléique (ADN) codant pour ladite protéine. On sait également que le code génétique est dégénéré. Ainsi, la séquence d'acides aminés du polypeptide de l'invention peut être issue de différentes séquences d'acide désoxyribonucléique, naturelles
20 ou synthétiques. Par séquence d'acide désoxyribonucléique synthétique, on entend ici toute séquence obtenue chimiquement ou par manipulation génétique.

Lesdites séquences d'acide désoxyribonucléique peuvent être issues de toutes origines possibles à savoir soit animale, en particulier de mammifères et encore plus particulièrement humaine, soit végétale, soit de micro-organismes (virus, phages, bactéries
25 entre autres) ou encore de champignons, sans préjuger du fait qu'elles soient présentes de manière naturelle ou non dans ledit organisme d'origine.

En l'occurrence, l'invention se rapporte aux fragments d'acide désoxyribonucléique isolés et purifiés codant les polypeptides revendiqués.

Au cours de ces travaux, la demanderesse a pu isoler et purifier les fragments
30 d'acide désoxyribonucléique codant les séquences primaires d'acides aminés des polypeptides de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 à partir de peau humaine.

L'invention a pour objet un fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié dont la séquence nucléotidique comprend au moins la séquence SEQ ID NO : 16 nucléotidique codante et en particulier est représentée par la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

5 Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention peuvent notamment être utilisées pour préparer des séquences d'acide ribonucléique correspondantes sens ou antisens.

L'invention a également pour objet tout polynucléotide, acide ribonucléique ou désoxyribonucléique, sens ou antisens, notamment « Small interferential RNA »,
10 correspondants au moins à la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

Les séquences d'acides nucléiques de l'invention peuvent également être utilisées pour réaliser des amorces oligonucléotidiques, qui s'hybrident dans des conditions de forte stringence à la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5,
15 SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16.

Ces amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens peuvent être utiles pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou toute autre variante de celle-ci dans le but de clonage, d'identification ou de diagnostic d'un polypeptide représentée par la séquence
20 SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 ou SEQ ID NO : 16.

Préférentiellement, les sondes ou amorces de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif,
25 chimiluminescent ou enzymatique.

Les méthodes de diagnostic in vitro dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en œuvre pour la détection de synthèses de séquences nucléiques codant pour un polypeptide selon l'invention sont incluses dans la présente invention.

Le fragment d'ADN correspondant à la séquence SEQ ID NO : 5,
30 SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 peut également être introduit dans un vecteur d'expression permettant ainsi la synthèse d'une protéine dite recombinante correspondante.

L'invention a donc également pour objet un vecteur d'expression recombinant

L'invention a pour objet un fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié dont la séquence nucléotidique comprend au moins la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 24 et en particulier est représentée par la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention peuvent notamment être utilisées pour préparer des séquences d'acide ribonucléique correspondantes sens ou antisens.

L'invention a également pour objet tout polynucléotide, acide ribonucléique ou désoxyribonucléique, sens ou antisens, notamment « Small interferential RNA », correspondants au moins à la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

Les séquences d'acides nucléiques de l'invention peuvent également être utilisées pour réaliser des amorces oligonucléotidiques, qui s'hybrident dans des conditions de forte stringence à la séquence SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 21, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24.

Ces amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens peuvent être utiles pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou toute autre variante de celle-ci dans le but de clonage, d'identification ou de diagnostic d'un polypeptide représentée par la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 ou SEQ ID NO : 16.

Préférentiellement, les sondes ou amorces de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent ou enzymatique.

Les méthodes de diagnostic in vitro dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en œuvre pour la détection de synthèses de séquences nucléiques codant pour un polypeptide selon l'invention sont incluses dans la présente invention.

Le fragment d'ADN correspondant à la séquence SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24 peut également être introduit dans un vecteur d'expression permettant ainsi la synthèse d'une protéine dite recombinante correspondante.

L'invention a donc également pour objet un vecteur d'expression recombinant

L'invention a pour objet un fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié dont la séquence nucléotidique comprend au moins la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 24 et en particulier est représentée par la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

5 Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention peuvent notamment être utilisées pour préparer des séquences d'acide ribonucléique correspondantes sens ou antisens.

L'invention a également pour objet tout polynucléotide, acide ribonucléique ou désoxyribonucléique, sens ou antisens, notamment « Small interferential RNA »,
10 correspondants au moins à la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

Les séquences d'acides nucléiques de l'invention peuvent également être utilisées pour réaliser des amorces oligonucléotidiques, qui s'hybrident dans des conditions de forte stringence à la séquence SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19,
15 SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 21, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24.

Ces amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens peuvent être utiles pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou toute autre variante de celle-ci dans le but de clonage, d'identification ou de diagnostic d'un polypeptide représentée par la séquence
20 SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 ou SEQ ID NO : 16.

Préférentiellement, les sondes ou amorces de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif,
25 chimioluminescent ou enzymatique.

Les méthodes de diagnostic in vitro dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en œuvre pour la détection de synthèses de séquences nucléiques codant pour un polypeptide selon l'invention sont incluses dans la présente invention.

Le fragment d'ADN correspondant à la séquence SEQ ID NO : 19,
30 SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24 peut également être introduit dans un vecteur d'expression permettant ainsi la synthèse d'une protéine dite recombinante correspondante.

L'invention a donc également pour objet un vecteur d'expression recombinant

contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

5 L'invention a également pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable une séquence d'acide désoxyribonucléique, naturelle ou synthétique, codant pour la séquence primaire d'acides aminés d'un polypeptide conforme à l'invention ou une séquence d'acide ribonucléique sens ou antisens, notamment antisens interférentiel, correspondants à ladite séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

10 D'une manière générale, toute composition de l'invention peut être ingérée, injectée ou appliquée sur la peau (sur toute zone cutanée du corps) ou sur les muqueuses (buccale, jugale, gingivale, génitale, conjonctivale, ...).

De préférence, une composition de l'invention est appliquée sur la peau ou les muqueuses.

15 Selon le mode d'administration considéré, elle peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées.

Pour une application topique sur la peau, la composition peut avoir la forme notamment de solutions aqueuses ou huileuses ou de dispersions du type lotion ou sérum, d'émulsions de consistance liquide ou semi-liquide du type lait, obtenues par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (H/E) ou inversement (E/H), ou de suspensions ou émulsions de consistance molle du type crème ou gel aqueux ou anhydres, ou encore de microcapsules ou microparticules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non ionique ou de mousses. Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles.

20 Pour l'injection, la composition peut se présenter sous forme de lotions aqueuses, huileuses ou sous forme de sérums. Pour les yeux, elle peut se présenter sous forme de gouttes et pour l'ingestion, elle peut se présenter sous forme de capsules, de granulés, de sirops ou de comprimés.

Les quantités des différents constituants des compositions selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

30 Dans le domaine de la cosmétique, ces compositions constituent notamment des crèmes de nettoyage, de protection, de traitement ou de soin pour le visage, pour les mains, pour les pieds, pour les grands plis anatomiques ou pour le corps (par exemple crèmes de jour, crèmes de nuit, crèmes de démaquillage, crèmes de fond de teint, crèmes

contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

L'invention a également pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable une séquence d'acide désoxyribonucléique, naturelle ou synthétique, codant pour la séquence primaire d'acides aminés d'un polypeptide conforme à l'invention ou une séquence d'acide ribonucléique sens ou antisens, notamment antisens interférentiel, correspondants à ladite séquence SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

D'une manière générale, toute composition de l'invention peut être ingérée, injectée ou appliquée sur la peau (sur toute zone cutanée du corps) ou sur les muqueuses (buccale, jugale, gingivale, génitale, conjonctivale, ...).

De préférence, une composition de l'invention est appliquée sur la peau ou les muqueuses.

Selon le mode d'administration considéré, elle peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées.

Pour une application topique sur la peau, la composition peut avoir la forme, notamment de solutions aqueuses ou huileuses ou de dispersions du type lotion ou sérum, d'émulsions de consistance liquide ou semi-liquide du type lait, obtenues par dispersion, d'une phase grasse dans une phase aqueuse (H/E) ou inversement (E/H), ou de suspensions ou émulsions de consistance molle du type crème ou gel aqueux ou anhydres, ou encore de microcapsules ou microparticules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non ionique ou de mousses. Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles.

Pour l'injection, la composition peut se présenter sous forme de lotions aqueuses, huileuses ou sous forme de sérums. Pour les yeux, elle peut se présenter sous forme de gouttes et pour l'ingestion, elle peut se présenter sous forme de capsules, de granulés, de sirops ou de comprimés.

Les quantités des différents constituants des compositions selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

Dans le domaine de la cosmétique, ces compositions constituent notamment des crèmes de nettoyage, de protection, de traitement ou de soin pour le visage, pour les mains, pour les pieds, pour les grands plis anatomiques ou pour le corps (par exemple crèmes de jour, crèmes de nuit, crèmes de démaquillage, crèmes de fond de teint, crèmes

contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

5 L'invention a également pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable une séquence d'acide désoxyribonucléique, naturelle ou synthétique, codant pour la séquence primaire d'acides aminés d'un polypeptide conforme à l'invention ou une séquence d'acide ribonucléique sens ou antisens, notamment antisens interférentiel, correspondants à ladite séquence SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

10 D'une manière générale, toute composition de l'invention peut être ingérée, injectée ou appliquée sur la peau (sur toute zone cutanée du corps) ou sur les muqueuses (buccale, jugale, gingivale, génitale, conjonctivale, ...).

De préférence, une composition de l'invention est appliquée sur la peau ou les muqueuses.

15 Selon le mode d'administration considéré, elle peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées.

Pour une application topique sur la peau, la composition peut avoir la forme notamment de solutions aqueuses ou huileuses ou de dispersions du type lotion ou sérum, d'émulsions de consistance liquide ou semi-liquide du type lait, obtenues par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (H/E) ou inversement (E/H), ou de suspensions
20 ou émulsions de consistance molle du type crème ou gel aqueux ou anhydres, ou encore de microcapsules ou microparticules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non ionique ou de mousses. Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles.

Pour l'injection, la composition peut se présenter sous forme de lotions aqueuses, huileuses ou sous forme de sérums. Pour les yeux, elle peut se présenter sous
25 forme de gouttes et pour l'ingestion, elle peut se présenter sous forme de capsules, de granulés, de sirops ou de comprimés.

Les quantités des différents constituants des compositions selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

30 Dans le domaine de la cosmétique, ces compositions constituent notamment des crèmes de nettoyage, de protection, de traitement ou de soin pour le visage, pour les mains, pour les pieds, pour les grands plis anatomiques ou pour le corps (par exemple crèmes de jour, crèmes de nuit, crèmes de démaquillage, crèmes de fond de teint, crèmes

anti-solaires), des fonds de teint fluides, des laits de démaquillage, des laits corporels de protection ou de soin, des laits anti-solaires, des lotions, gels ou mousses pour le soin de la peau, comme des lotions de nettoyage, des lotions anti-solaires, des lotions de bronzage artificiel, des compositions pour le bain, des compositions désodorisantes comprenant un

5 agent bactéricide, des gels ou lotions après-rasage, des crèmes épilatoires, des compositions contre les piqûres d'insectes, des compositions anti-douleur, des compositions pour traiter certaines maladies de la peau comme l'eczéma, la rosacée, le psoriasis, les lichens et les prurits sévères.

10 Les compositions selon l'invention peuvent également consister en des préparations solides constituant des savons ou des pains de nettoyage.

Les compositions peuvent aussi être conditionnées sous forme de composition pour aérosol comprenant également un agent propulseur sous pression.

15 Une composition selon l'invention peut aussi être une composition pour les soins du cuir chevelu, et notamment un shampoing, une lotion de mise en plis, une lotion traitante, une crème ou un gel coiffant, une composition de teintures (notamment teintures d'oxydation) éventuellement sous forme de shampoings colorants, de lotions restructurantes pour les cheveux, une composition de permanente (notamment une composition pour le premier temps d'une permanente), une lotion ou un gel antichute, un

shampoing antiparasitaire, antipelliculaire etc.

20 Une composition peut aussi être à usage bucco-dentaire, par exemple une pâte dentifrice. Dans ce cas, la composition peut contenir des adjuvants et additifs usuels pour les compositions à usage buccal et notamment des agents tensioactifs, des agents épaississants, des agents humectants, des agents de polissage tels que la silice, divers ingrédients actifs comme les fluorures, en particulier le fluorure de sodium, et

25 éventuellement des agents édulcorants comme le saccharinate de sodium.

Lorsque la composition est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut varier d'environ 5 % à 80 % en poids, et de préférence d'environ 5 % à 50 % en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les cires, les émulsionnants et les co-

30 émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine cosmétique. L'émulsionnant et le co-émulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3 % à 30 % en poids, et de préférence de 0,5 % à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition.

L'émulsion peut, en outre, contenir des vésicules lipidiques.

Lorsque la composition est une solution ou un gel huileux, la phase grasse peut représenter plus de 90 % du poids total de la composition.

De façon connue, la composition cosmétique peut contenir également des
 5 adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les additifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les absorbeurs d'odeurs et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans le domaine cosmétique, et par exemple varient d'environ 0,01 % à 10 % du poids
 10 total de la composition. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse et/ou dans les sphérules lipidiques.

Comme huiles ou cires utilisables dans l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles végétales (fraction liquide du beurre de karité, huile de tournesol), les huiles animales (perhydrosqualène), les huiles de synthèse (huile de
 15 Purcellin), les huiles ou cires siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers), les cires d'abeille, de carnauba ou paraffine. On peut ajouter à ces huiles des alcools gras et des acides gras (acide stéarique). Comme émulsionnants utilisables dans l'invention, on peut citer par exemple le stéarate de glycérol, le polysorbate 60 et le mélange de PEG-6/PEG-32/Glycol Stéarate vendu sous la dénomination de
 20 Tefose[®] 63 par la société Gattefosse.

Comme solvants utilisables dans l'invention, on peut citer les alcools inférieurs notamment l'éthanol et l'isopropanol et le propylène glycol.

Comme gélifiants hydrophiles utilisables dans l'invention, on peut citer les polymères carboxyviniliques (carbomer[®]), les copolymères acryliques tels que les
 25 copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides tels que l'hydroxypropylcellulose, les gommes naturelles et les argiles, et, comme gélifiants lipophiles, on peut citer les argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras comme les stéarates d'aluminium, la silice hydrophobe, l'éthylcellulose et le polyéthylène.

30 La composition peut contenir d'autres actifs hydrophiles comme les protéines ou les hydrolysats de protéines, les acides aminés, les polyols, l'urée, l'allantoïne, les sucres et les dérivés de sucre, les vitamines hydrosolubles, les extraits végétaux et les

hydroxyacides.

Comme actifs lipophiles, on peut utiliser le rétinol (vitamine A) et ses dérivés, le tocophérol (vitamine E) et ses dérivés, les acides gras essentiels, les céramides, les huiles essentielles, l'acide salicylique et ses dérivés.

5 Selon l'invention la composition peut associer au moins un autre agent actif destiné notamment à la prévention et/ou au traitement des affections cutanées. Parmi ces agents actifs, on peut citer à titre d'exemple :

- les agents diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation cutanée tels que l'acide rétinoïque et ses isomères, le rétinol et ses esters, la
10 vitamine D et ses dérivés, les oestrogènes tels que l'oestradiol, l'acide kojique ou l'hydroquinone ;
- les antibactériens tels que le phosphate de clindamycine, l'érythromycine ou les antibiotiques de la classe des tétracyclines ;
- les antiparasitaires, en particulier le métronidazole, le crotamiton ou
15 les pyréthriinoïdes ;
- les antifongiques, en particulier les composés appartenant à la classe des imidazoles tels que l'éconazole, kétoconazole ou le miconazole ou leurs sels, les composés polyènes, tels que l'amphotéricine B, les composés de la famille des allylamines, tels que la terbinafine, ou encore l'octopirox ;
- 20 - les agents antiviraux tels que l'acyclovir ;
- les agents anti-inflammatoires stéroïdiens, tels que l'hydrocortisone, le valérate de bétaméthasone ou le propionate de clobétasol, ou les agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens comme par exemple l'ibuprofène et ses sels, le diclofénac et ses sels, l'acide acétylsalicylique, l'acétaminophène ou l'acide glycyrrhizique ;
- 25 - les agents anesthésiques tels que le chlorhydrate de lidocaïne et ses dérivés ;
- les agents antiprurigineux comme la thénaldine, la triméprazine ou la cyproheptadine ;
- les agents kératolytiques tels que les acides α - et β -
30 hydroxycarboxyliques ou β -cétocarboxyliques, leurs sels, amides ou esters et plus particulièrement les hydroxyacides tels que l'acide glycolique, l'acide lactique, l'acide salicylique, l'acide citrique et de manière générale les acides de fruits, et l'acide n-

octanoyl-5-salicylique ;

- les agents anti-radicaux libres, tels que l' α -tocophérol ou ses esters, les superoxyde dismutases, certains chélatants de métaux ou l'acide ascorbique et ses esters ;

- 5 - les antiséborrhéiques tels que la progestérone ;
- les antipelliculaires comme l'octopirox ou la pyrithione de zinc ;
- les antiacnéiques comme l'acide rétinoïque ou le peroxyde de benzoyle.

10 Ainsi, selon le mode particulier, la composition selon l'invention comprend également au moins un agent choisi parmi les agents antibactériens, antiparasitaires, antifongiques, antiviraux, anti-inflammatoires, antiprurigineux, anesthésiques, kératolytiques, anti-radicaux libres, anti-séborrhéiques, antipelliculaires, antiacnéiques et/ou les agents diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation cutanée.

15 Les exemples figurant ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de l'invention.

FIGURES :

- 20 - Figure 1 : Photographie du gel d'électrophorèse 2D obtenu selon l'exemple I,
- Figure 2 : Représentation de l'influence du pH sur l'activité protéolytique de la SASPase,
- Figure 3 : Analyse de l'activité d'un certain nombre de modulateurs conventionnels vis-à-vis de l'activité protéolytique de la SASPase,
- 25 - Figure 4 : Représentation des homologues de structure entre la SASPase et des protéases,
- Figure 5 : Représentation des séquences nucléotidique et peptidique de la SEQ ID NO : 5,
- 30 - Figure 6 : Représentation des séquences nucléotidiques et peptidiques des séquences SEQ ID NO : 4 et SEQ ID NO : 7,
- Figure 7 : Représentation des séquences nucléotidiques et peptidiques des séquences SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 6.

octanoyl-5-salicylique ;

- les agents anti-radicaux libres, tels que l' α -tocophérol ou ses esters, les superoxyde dismutases, certains chélatants de métaux ou l'acide ascorbique et ses esters ;
- les antiséborrhéiques tels que la progestérone ;
- les antipelliculaires comme l'octopirox ou la pyrithione de zinc ;
- les antiacnéiques comme l'acide rétinoïque ou le peroxyde de benzoyle.

Ainsi, selon le mode particulier, la composition selon l'invention comprend également au moins un agent choisi parmi les agents antibactériens, antiparasitaires, antifongiques, antiviraux, anti-inflammatoires, antiprurigineux, anesthésiques, kératolytiques, anti-radicaux libres, anti-séborrhéiques, antipelliculaires, antiacnéiques et/ou les agents diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation cutanée,

Les exemples figurant ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de l'invention.

FIGURES :

- Figure 1 : Photographie du gel d'électrophorèse 2D obtenu selon l'exemple I,
- Figure 2 : Représentation de l'influence du pH sur l'activité protéolytique de la SASPase,
- Figure 3 : Analyse de l'activité d'un certain nombre de modulateurs conventionnels vis-à-vis de l'activité protéolytique de la SASPase,
- Figure 4 : Représentation des homologies de structure entre la SASPase et des protéases,
- Figure 5 : Représentation de la séquence peptidique de la SEQ ID NO : 5, et de la séquence nucléotidique correspondante SEQ ID NO : 19,
- Figure 6 : Représentation des séquences peptidiques des séquences SEQ ID NO : 4 et SEQ ID NO : 7 et de leurs séquences nucléotidiques correspondantes SEQ ID NO : 18 et SEQ ID NO : 21,
- Figure 7 : Représentation des séquences peptidiques SEQ ID NO : 8,

octanoyl-5-salicylique ;

- les agents anti-radicaux libres, tels que l' α -tocophérol ou ses esters, les superoxyde dismutases, certains chélatants de métaux ou l'acide ascorbique et ses esters ;

- 5 - les antiséborrhéiques tels que la progestérone ;
- les antipelliculaires comme l'octopirox ou la pyrithione de zinc ;
- les antiacnéiques comme l'acide rétinoïque ou le peroxyde de benzoyle.

10 Ainsi, selon le mode particulier, la composition selon l'invention comprend également au moins un agent choisi parmi les agents antibactériens, antiparasitaires, antifongiques, antiviraux, anti-inflammatoires, antiprurigineux, anesthésiques, kératolytiques, anti-radicaux libres, anti-séborrhéiques, antipelliculaires, antiacnéiques et/ou les agents diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation cutanée.

15 Les exemples figurant ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de l'invention.

FIGURES :

- 20 - Figure 1 : Photographie du gel d'électrophorèse 2D obtenu selon l'exemple I,
- Figure 2 : Représentation de l'influence du pH sur l'activité protéolytique de la SASPase,
- Figure 3 : Analyse de l'activité d'un certain nombre de modulateurs conventionnels vis-à-vis de l'activité protéolytique de la SASPase,
- 25 - Figure 4 : Représentation des homologues de structure entre la SASPase et des protéases,
- Figure 5 : Représentation de la séquence peptidique de la SEQ ID NO : 5, et de la séquence nucléotidique correspondante SEQ ID NO : 19,
- Figure 6 : Représentation des séquences peptidiques des séquences SEQ ID NO : 4 et SEQ ID NO : 7 et de leurs séquences nucléotidiques correspondantes SEQ ID NO : 18 et SEQ ID NO : 21,
- 30 - Figure 7 : Représentation des séquences peptidiques SEQ ID NO : 8,

- Figure 8 : Représentation des séquences nucléotidique et peptidique de la séquence SEQ ID NO : 16.

EXEMPLES

Matériels

Les oligonucléotides utilisés dans les différentes expériences sont présentés ci-après dans le tableau I.

TABLEAU I

Nom de l'amorce	Séquence 5' à 3'	SEQ ID N°
SC 130	GATAGGATCCATGGCCGGGAGCGGAGCCAGGAG	12
SC 131	TTGAATTCTCAGTGGGATAGCTCCTGCCGC	11
SC 134	GGCCCTGGGTGTCTACAATA	13
SC 135	TTGGCCACCTTTACCACATT	14
SC 140	TAGGATCCATGGGGAGCCCAGGGGC	10
Not I-(dT) ₁₈ est un oligonucléotide vendu par la société Amersham Pharmacia Biotech		

Not I-(dT)₁₈ est conçu pour se fixer aux longues séries de A, par exemple les poly A +. Utilisé dans les réactions de transcription inverse, Not I-(dT)₁₈ se fixe au poly A +.

EXEMPLE I – Identification et isolement de la SASPase par électrophorèse bidimensionnelle sur gel et séquençage

a) Préparation à partir d'épiderme humain

Tampons :

I : SDS 0,3 % ; tris-HCl 28 mM ; tris-base 22 mM

2D : 8M urée ; 2 % (p/v) 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) ; Dithiothréitol 20 mM ; tampon 0,5 % (v/v) Imobiline pH gradient (IPG) pH = 3 9-10 de 18 cm commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech.

Des extraits d'épiderme reconstruit humain sont préparés à partir de 30 nacelles du kit Episkin J13. 15 ml de tampon I sont ajoutés aux 30 épidermes reconstruits et le tout est pottérisé, porté à ébullition pendant 10 mn puis repottérisé. La

SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 6 et de leurs séquences nucléotidiques correspondantes SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 23, SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 20.

- Figure 8 : Représentation de la séquence peptidique SEQ ID NO : 16 et de la séquence nucléotidique correspondante SEQ ID NO : 24.

EXEMPLES

Matériels

Les oligonucléotides utilisés dans les différentes expériences sont présentés ci-après dans le tableau I.

TABLEAU I

Nom de l'amorce	Séquence 5' à 3'	SEQ ID N°
SC 130	GATAGGATCCATGGCCGGGAGCGGAGCCAGGAG	12
SC 131	TTGAATTCTCAGTGGGATAGCTCCTGCCGC	11
SC 134	GGCCCTGGGTGTCTACAATA	13
SC 135	TTGGCCACCTTTACCACATT	14
SC 140	TAGGATCCATGGGGAGCCCAGGGGC	10
Not I-(dT) ₁₈ est un oligonucléotide vendu par la société Amersham Pharmacia Biotech		

Not I-(dT)₁₈ est conçu pour se fixer aux longues séries de A, par exemple les poly A +. Utilisé dans les réactions de transcription inverse, Not I-(dT)₁₈ se fixe au poly A +.

EXEMPLE I – Identification et isolement de la SASPase par électrophorèse bidimensionnelle sur gel et séquençage

a) Préparation à partir d'épiderme humain

Tampons :

I : SDS 0,3 % ; tris-HCl 28 mM ; tris-base 22 mM

2D : 8M urée ; 2 % (p/v) 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) ; Dithiothréitol 20 mM ; tampon 0,5 % (v/v) Imobiline pH gradient (IPG) pH = 3 9-10 de 18 cm commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech.

Des extraits d'épiderme reconstruit humain sont préparés à partir de 30 nacelles du kit Episkin J13. 15 ml de tampon I sont ajoutés aux 30 épidermes

SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 6 et de leurs séquences nucléotidiques correspondantes SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 23, SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 20.

- 5 - Figure 8 : Représentation de la séquence peptidique SEQ ID NO : 16 et de la séquence nucléotidique correspondante SEQ ID NO : 24.

EXEMPLES

Matériels

Les oligonucléotides utilisés dans les différentes expériences sont présentés ci-après dans le tableau I.

10

TABLEAU I

Nom de l'amorce	Séquence 5' à 3'	SEQ ID N°
SC 130	GATAGGATCCATGGCCGGGAGCGGAGCCAGGAG	12
SC 131	TTGAATTCTCAGTGGGATAGCTCCTGCCGC	11
SC 134	GGCCCTGGGTGTCTACAATA	13
SC 135	TTGGCCACCTTTACCACATT	14
SC 140	TAGGATCCATGGGGAGCCCAGGGGC	10
Not I-(dT) ₁₈ est un oligonucléotide vendu par la société Amersham Pharmacia Biotech		

Not I-(dT)₁₈ est conçu pour se fixer aux longues séries de A, par exemple les poly A₂+. Utilisé dans les réactions de transcription inverse, Not I-(dT)₁₈ se fixe au poly A+.

EXEMPLE I – Identification et isolement de la SASPase par électrophorèse

15 bidimensionnelle sur gel et séquençage

a) Préparation à partir d'épiderme humain

Tampons :

I : SDS 0,3 % ; tris-HCl 28 mM ; tris-base 22 mM

- 20 2D : 8M urée ; 2 % (p/v) 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) ; Dithiothréitol 20 mM ; tampon 0,5 % (v/v) Imobiline pH gradient (IPG) pH = 3 9-10 de 18 cm commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech.

- 25 Des extraits d'épiderme reconstruit humain sont préparés à partir de 30 nacelles du kit Episkin J13. 15 ml de tampon I sont ajoutés aux 30 épidermes reconstruits et le tout est pottérisé, porté à ébullition pendant 10 mn puis repottérisé. La

solution est alors centrifugée à 10.000 g pendant 10 mn. Le surnageant est recueilli et filtré sur membrane 0,22 µm. On obtient ainsi 12 ml de surnageant SI. On ajoute alors au surnageant SI, de l'acétone froide (10 v/2v). Après 20 mn d'incubation, on centrifuge le mélange obtenu à 9.400 g pendant 10 mn. Le surnageant est alors éliminé et le culot est séché à température ambiante pendant 20 mn. Le culot est alors repris dans 2 ml de tampon 2D. On obtient ainsi l'extrait EI. La concentration en protéine finale est de 11 mg/ml.

b) Gel bidimensionnel

La séparation en deux dimensions des protéines contenues dans l'extrait EI est réalisée sur un appareil de marque Pharmacia (modèle Multiphor II). La séparation en deux dimensions des protéines a été réalisée selon les recommandations du fournisseur hormis le fait que pour la rééquilibration du gel IPG après migration dans la première direction, l'iodoacétamide a été omis. La coloration des spots, la récupération de ceux-ci et le séquençage des polypeptides qu'ils contenaient ont été réalisés selon les techniques décrites dans « gel electrophoresis of proteins » (Méhul B, Bernard D, Simonetti L, Bernard MA, Schmidt R : Identification and cloning of a new calmodulin-like protein from human epidermis. J Biol Chem 275 : 12841-12347, 2000), ou encore « A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing » (Paul Matsudaira éditeur, seconde édition 1993). En figure 1 est représenté le gel d'électrophorèse correspondant.

Les protéines ont été détectées par une coloration à l'amide black. Les spots correspondant à des protéines identifiées par séquençage d'Edman sont localisés avec le nom de ces protéines. Le spot nommé SASPase permet de localiser une forme épidermique de la protéine ayant un PM apparent de 12 kD et un pI de 5,8.

Les résultats obtenus ont permis de caractériser les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3.

EXEMPLE II - Isolement de l'ADNc codant la SASPase à partir de kératinocyte humain et expression de la SASPase (SEQ ID NO : 5) et de sa forme tronquée (Δ 1-84) (SEQ ID NO : 4)

a) Préparation de L'ADNc

Les ARN totaux de kératinocytes provenant d'épiderme humain reconstruit après 13 jours de culture ont été préparés à l'aide du kit de préparation d'ARN « RNeasy

Kit[®] » et purifiés à l'aide du kit « QIAshredder column[®] », commercialisé par la société QIAGEN selon les instructions du fournisseur.

Les ADN complémentaires (ADNc) des ARN ainsi préparés ont été synthétisés à l'aide du kit « First Strand cDNA Synthesis[®] » commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech selon les instructions du fournisseur en utilisant comme amorce, l'oligonucléotide Not I-(dT)₁₈.

Des fragments d'ADNc codant pour la SASPase complète ainsi obtenus ont été amplifiés par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) dans un appareil à cycles thermiques « Thermocycler[®] » commercialisé par la société Perkin-Elmer en utilisant une ADN polymérase pfu commercialisée par la société Promega et comme amorces, le couple d'oligonucléotides SC140 (SEQ ID NO : 10)/SC131 (SEQ ID NO : 11) et les conditions suivantes : 1 cycle (95°C pendant 2 mn.), 35 cycles (94°C pendant 30 sec., 65°C pendant 30 sec., 72°C pendant 2 mn.) et 1 cycle (72°C pendant 7 mn.).

De façon similaire, des fragments d'ADNc codant pour la forme tronquée de la SASPase (SEQ ID NO : 4), dépourvue des 84 résidus d'acides aminés N-terminaux de la SASPase dite Δ 1-84 ont été amplifiés par PCR en utilisant comme amorces, le couple d'oligonucléotides SC131/SC130 (SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12).

b) Construction et expression de la SASPase recombinante (rSASPase)

L'ADNc de la SASPase obtenu précédemment est introduit dans le vecteur plasmidique pGex-4T-3 commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech, par coupure/ligature aux sites de restriction BamH-1/EcoR1. Ce plasmide recombinant qui contient en phase dans le cadre de lecture, la séquence codante de la SASPase (SEQ ID NO : 5) et la séquence codante de la glutathion S-transférase (GST) est alors introduit dans *E. coli* souche BL21 (DE3) commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech. La protéine de fusion recombinante exprimée par les bactéries peut être coupée par la thrombine dans des conditions douces, la construction étant telle que la protéine de fusion obtenue porte un site de coupure par cette protéase.

Le produit d'expression est purifié par chromatographie d'affinité sur colonne glutathion-sépharose.

L'ensemble de ces expériences a été réalisé en appliquant strictement les différents protocoles des fournisseurs.

L'analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE d'une fraction aliquote du

produit d'expression obtenu par mise en oeuvre de la méthode décrite précédemment montre que cette méthode permet l'obtention en quantité satisfaisante de la protéine de fusion recombinante GST-SASPase.

De façon similaire, on a obtenu l'expression en quantité satisfaisante de la protéine de fusion recombinante GST-SASPase tronquée Δ 1-84 (SEQ ID NO : 4).

EXEMPLE III - Obtention de la SASPase activée (SEQ ID NO : 6)

La protéine de fusion recombinante GST-SASPase Δ 1-84 (SEQ ID NO : 4) élue de la colonne glutathion sépharose obtenue à l'exemple II, est incubée avec de la thrombine dans du tampon PBS, à pH8 pendant 18 heures à 22°C. Le tampon est échangé par filtration sur gel G25® Biorad contre une solution 100 mM acétate, pH 4,5. Le mélange ainsi obtenu est soumis à une chromatographie cationique en utilisant un gradient de NaCl (0 à 1 M NaCl). Les fractions contenant la GST et la thrombine sont éliminées et la fraction élue par la solution à 750 mM de NaCl est récupérée. Une analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE effectuée sur la fraction élue par la solution de NaCl à 750 mM, contenant une activité caséinolytique (donnée non présentée) montre la présence d'une bande majoritaire qui, par comparaison avec les marqueurs de masses moléculaires présente une masse moléculaire apparente de 12kD et une bande minoritaire qui correspond à la forme tronquée SASPase Δ 1-84 (SEQ ID NO : 4).

La forme de 12kD correspond à la forme activée de la SASPase. Le séquençage d'Edman indique que le produit isolé correspond à la SASPase activée (SEQ ID NO : 6).

EXEMPLE IV – Caractérisation de l'activité protéolytique de la protéine

SASPase

a) Activité vis-à-vis d'un substrat

Cette activité a été démontrée selon le protocole suivant :

L'insuline chaine Beta oxydée (Sigma) est utilisée comme substrat. La concentration est de 50µg dans 1,5 ml de tampon acétate 0,1M pH 5,0. On ajoute 50 µl de SASPase 12 kD purifiée (SEQ ID NO : 6) (environ 1mg/ml) par gel filtration pour initialiser l'hydrolyse. Des témoins sans enzyme ou sans substrat sont utilisés comme contrôles. Au cours du temps (1h à 24h à 37° C) des HPLC sont effectuées pour suivre

l'hydrolyse. Les pics apparaissant rapidement correspondent aux sites d'hydrolyse principaux et ceux n'apparaissant qu'au bout de 24h aux sites secondaires. Les pics sont collectés après leur fractionnement et séquencés en N-terminal (séquençage d'EDMAN, Institut Pasteur).

5 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF (SEQ ID NO : 15).

Site principal : E/A (de type pepsin-like)

Sites secondaires : L/Y et Y/L (de type pepsin-like)

Ces résultats montrent que la SASPase activée est capable de dégrader l'insuline. La dénaturation thermique (95° C – 10 mn) de la SASPase abolit son activité de
10 dégradation de l'insuline. Son activité caséinolytique a par ailleurs été démontrée (résultats non présentés).

b) Activité autocatalytique

Dans ce second essai, c'est la protéine GST-SASPase (SEQ ID NO : 4) qui est elle-même utilisée comme substrat par autocatalyse.

15 La GST-SASPase à 3mg/ml dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,0 50 % glycérol est acidifiée rapidement à pH 5,0 par du tampon acétate 1M pH 4,5. A chaque temps d'incubation à 37° C un aliquot est pris et la réaction est bloquée par l'ajout d'un équivalent volume de tampon Laemmli sans DTT. A la fin de la cinétique chaque échantillon est analysé par électrophorèse SDS-PAGE (Gel à 15 % d'acrylamide)
20 démontrant une apparition progressive d'une bande majoritaire migrant à un PM apparent de 12 kD consécutive à la disparition de la protéine de fusion.

Cet essai montre que l'on peut également obtenir directement la SASPase activée (SEQ ID NO : 6) par acidification à pH 3 à 6, de préférence 4 à 6 de la protéine de fusion recombinante GST-rSASPase Δ 1-84 ou GST-SASPase obtenues à l'exemple I suivi
25 par une étape de purification par filtration sur gel (G75).

Par ailleurs, l'analyse des solutions activées par séquençage Edman et par spectromètre de masse de type QTOF fournit pour la protéase autoactivée trois sites de clivage à peu près équivalents en probabilités :

F/A (comme certaines cutané métalloprotéases)

30 N/S (site de coupure non répertorié)

E/L (uniquement décrit pour la matrilysine qui est capable d'activer l'urokinase et les MMP 1, 2 et 9.)

EXEMPLE V - Analyse de l'expression de la SASPase par Northern Blot, RT-PCR dans des tissus humains et dans des kératinocytes.

Les analyses ont été effectuées par Northern Blot, en utilisant des membranes commerciales polyA + ARN blot (Ambion®) selon le protocole décrit par le fabricant, et par RT-PCR en utilisant une collection d'ADNc des membranes « rapid-scan® » humaines commercialisées par la société OriGene Technologies, Inc.

L'analyse par Northern Blot a été effectuée en utilisant comme sonde l'ADNc codant la forme (tronquée Δ1-84) de la SASPase (SEQ ID NO : 4) isolée à partir du plasmide recombinant préparé à l'exemple II et à l'aide d'une membrane contenant différents échantillons d'ARN.

La PCR est effectuée en utilisant la Taq polymérase commercialisée par la société Promega, comme amorces, le couple d'oligonucléotides SC134 (SEQ ID NO : 13)/SC135 (SEQ ID NO : 14) dans les conditions suivantes :

- 1 cycle de 3 mn. à 94°C,
- 25 à 30 cycles (94°C pendant 30 sec., 53°C pendant 30 sec., 72°C pendant 60 sec.), et
- 1 cycle à 72°C pendant 5 mn.

Les produits de PCR résultants sont visualisés par coloration au bromure d'éthidium après séparation sur gel d'agarose 2 % (poids/volume).

Des résultats, il ressort que la SASPase est sensiblement exprimée dans la quasi-totalité des tissus testés à un niveau faible dans les foie foetal, cerveau foetal, ovaire, glande surrénale, thyroïde, placenta, testicules, estomac, muscle, poumon, foie, rate et cœur, et encore plus faible dans la moelle osseuse, le pancréas, la salive, et l'intestin grêle. Cette expression est en revanche significative dans le cerveau et particulièrement très élevée dans la peau.

EXEMPLE VI - Oligomérisation de la SASPase utilisant un réactif de réticulation

Le protocole utilisé s'inspire de la technique décrite dans T.D. Meek *et al.* ; Proc, Natl. Acad. Sci. USA vol. 86, pages 1841-1845, March 1989.

Une étude de la réticulation utilisant du BS3 (Pierce) est effectuée sur de la

SASPase activée (SEQ ID NO : 6), obtenue par acidification et purification par chromatographie d'exclusion (gel filtration) de la protéine de fusion recombinante GST-SASPase Δ 1-84.

A la SASPase activée (SEQ ID NO : 6) obtenue à l'exemple III, placée dans de la glace, on ajoute 1 μ g de BS3 dans 60 μ l de tampon phosphate 50 mM, pH 7, contenant 150 mM NaCl, 0,1 % TX100, 5 mM EDTA. On prépare également un échantillon témoin exempt de BS3. Après 90 mn, on introduit dans les milieux réactionnels 2 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 8, pour stopper la réaction. On analyse ensuite les produits obtenus par gel filtration sur gel, et par électrophorèse SDS-PAGE.

La SASPase activée incubée avec du BS3 forme un complexe multimérique stable qui par gel filtration sur gel, se sépare en trois pics majeurs. Trois bandes distinctes sont également observables sur gel après électrophorèse SDS-PAGE dont les masses moléculaires apparentes, déterminées par comparaison avec les marqueurs des masses moléculaires sont respectivement de 12kD, comprises entre 10-14kD, 30-45kD et 60-100kD.

EXEMPLE VII - Influence du pH sur l'activité protéolytique de SASPase

10 μ l de protéines de fusion GST-SASPase Δ 1-84 (environ 3 mg/ml) obtenus à l'exemple II sont incubés dans 200 μ l de tampon acétate 0,1 M, ajusté à différents pH en présence du substrat caséine commercialisé sous la dénomination de Enzchek[®] par la société Molecular Probes et utilisé aux concentrations préconisées par le fournisseur.

Trois répétitions sont effectuées pour chaque essai.

Après 20 heures d'incubation à 37°C, la fluorescence est mesurée sur un lecteur de plaque commercialisé sous la dénomination de Biolumin[®] par la société Molecular Probes en utilisant le couple excitation/émission : 485/535 nm. Les résultats sont présentés en figure 2.

Ces résultats montrent que dans les conditions expérimentales retenues, l'activité enzymatique de la SASPase est dépendante du pH et présente un optimum à pH 5. Par ailleurs, des essais non présentés en tampon phosphate 0,1 M de pH 6 à 7,5 ne montrent qu'une faible activité résiduelle.

L'influence du pH sur l'auto-activation est également réalisée et montre une optimisation pour des pH entre 3 et 6,9 et de préférence entre 4 et 6.

EXEMPLE VIII - Etude de l'effet de différents inhibiteurs de la famille des protéases à acide aspartique sur l'activité caséinolytique de la SASPase activée (SEQ ID NO : 6)

5 10 µl de SASPase activée (SEQ ID NO : 6) auto-activés (environ 3 mg/ml), sont ajoutés dans 200 µl de tampon acétate 0,1 M, pH 5,5, contenant 20 µl de DMSO avec des inhibiteurs de rétropepsines. Un essai témoin est effectué dans les mêmes conditions en absence d'inhibiteur.

10 On pré-incube le mélange pendant 1 heure à 4°C, puis on ajoute le substrat, de la caséine commercialisée sous la dénomination Enzchzek[®] par la société Molecular Probes en quantité suffisante pour obtenir la concentration préconisée par le fournisseur, les solutions ayant été préalablement réchauffées à 37°C.

15 Le suivi de l'hydrolyse de la caséine est effectué par mesure de la fluorescence sur un lecteur de plaques Biolumin[®] commercialisé par la société Molecular Probes en utilisant le couple excitation/émission : 485/535 nm.

 Les résultats obtenus sont présentés en figure 3. On constate que les cinétiques d'hydrolyse de la caséine, en présence des inhibiteurs de rétropepsines RP1 et RP2 sont plus faibles que le témoin. L'activité de la SASPase est donc inhibée par ces inhibiteurs.

20 - RP1 correspond à la séquence Ac-Leu-Val-Phe-aldéhyde et est commercialisé par Bachem sous la référence N 1395.0005,

 - RP2 correspond à la séquence Ac-Leu-Leu-Met-aldéhyde et est commercialisé par Bachem sous la référence N 1315.0005 et

 - RP3 correspond à la séquence Ac-Leu-Leu-Nle-aldéhyde et est commercialisé par Bachem sous la référence N 1320.0005.

25 On constate en outre que la cinétique d'hydrolyse de la caséine, en présence de de l'inhibiteur de rétropepsine RP3, est significativement plus élevée que celle obtenue dans les conditions témoins. L'activité de la SASPase semble donc être stimulée par cet inhibiteur.

EXEMPLE IX- Etude de l'effet de la SASPase activée (SEQ ID NO : 6) sur la dégradation de la cornéodesmosine extraite de stratum corneum humain.

a) Principe

La cornéodesmosine est un marqueur de la desquamation car elle intervient dans la cohésion cornéocytaire au niveau des cornéodesmosomes. Plus la protéine est dégradée, plus le détachement des cornéocytes est significatif. La dégradation de la cornéodesmosine est donc une étape clé de la desquamation.

Le test utilisé dans cette étude consiste donc à suivre cette dégradation en présence de la substance à tester.

10 b) Préparation de l'échantillon

Des poudres acétoniques sont préparées à partir de stripping vernis (Méhul B, Bernard D, Simonetti L, Bernard MA, Schmidt R : Identification and cloning of a new calmodulin-like protein from human epidermis. J Biol Chem 275 : 12841-12347, 2000) prélevés sur des bas de jambes de personnes volontaires à peau sèche. Des fractions aliquotes de 2 mg de poudre de *stratum corneum* sont introduites séparément dans des tubes Eppendorfs, puis immergées dans les solutions à tester à raison de 100 µl/mg. Les solutions sont préparées en tampon acétate pH 5. Un témoin sans protéase est préparé en parallèle afin d'évaluer la dégradation naturelle de la cornéodesmosine. Pour chaque test, on prépare trois échantillons. Un échantillon est placé à -20°C (t0) et correspond aux 100 % de cornéodesmosines résiduelles. Les deux autres échantillons, traité et un non traité (t24h), sont incubés à 30°C sous agitation pendant 24 heures.

c) Extraction, séparation et détection des protéines.

Les protéines sont extraites avec du tampon Laemmli complet. Elles sont dosées par la méthode de Bradford (kit Bio-Rad®). La concentration de chaque échantillon est ajustée pour permettre la comparaison des échantillons. Les polypeptides sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur gel d'acrylamide 15 %, puis transférés sur membrane de PVDF. Une immuno-détection par une solution d'anticorps anti-cornéodesmosine utilisée au 1/12500 et d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase permet de révéler la cornéodesmosine. Les bandes détectées par chimio-luminescence sont quantifiées à l'aide du logiciel Quantity One® de la société Biorad. Les membranes sont ensuite colorées à l'amido-black, puis scannées. En outre, les kératines qui sont des protéines majoritaires des extraits cornéocytaires sont quantifiées afin de vérifier l'ajustement à 0,6 mg/ml de tous les

échantillons.

Un témoin positif de dégradation (+) est préparé en utilisant 5 ml d'EDTA. Un essai est réalisé en présence de 60 µg de SASPase activée. Un témoin négatif représente la dégradation naturelle de la cornéodesmosine dans les conditions opératoires du test.

5

d) Résultats

TABLEAU II

	<i>Cornéodesmosine normalisée</i>		<i>Cornéodesmosine résiduelle %</i>
	T0	T24h	T24h/T0*100
SASPase activée	33107	24918	75
Témoin +	31657	26685	84
Témoin -	32701	30546	93

On constate une diminution significative du pourcentage de cornéodesmosine résiduelle lorsque les poudres acétoniques de stratum corneum sont mises en contact avec la SASPase activée (SEQ ID NO : 6) par rapport aux témoins.

10

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé et purifié appartenant à la famille des protéases à acide aspartique, caractérisé en ce qu'il possède une séquence peptidique représentée en tout ou
5 partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou leurs homologues.
2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que sa séquence peptidique est représentée par la séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.
3. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que sa séquence
10 peptidique est représentée par la SEQ ID NO : 5.
4. Polypeptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il possède une masse moléculaire apparente comprise entre 5 et 30 kD, plus particulièrement entre 9 et 15 kD et notamment entre 11 et 14 kD.
5. Polypeptide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il possède une
15 masse moléculaire apparente comprise entre 30 et 40 kD, particulièrement entre 32 et 39 kD et notamment entre 35 et 38 kD.
6. Polypeptide selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que sa séquence se présente sous une forme multimère et de préférence dimère.
7. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes,
20 caractérisé en ce qu'il possède un point isoélectrique théorique compris entre 3 et 9.
8. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est d'origine naturelle et purifié à partir de tissus de mammifères.
9. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il est purifié à partir de peau humaine et plus particulièrement à partir d'épiderme
25 humain.
10. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il a subi une ou plusieurs modifications post-traductionnelles.
11. Polypeptide selon la revendication 1 ou l'une des revendications 6 à 10, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un polypeptide de séquence
30 SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 fusionné avec un autre polypeptide, un agent de ciblage hydrophile ou hydrophobe ou un précurseur de bioconversion.
12. Composition cosmétique comprenant dans un milieu physiologiquement

acceptable, au moins un polypeptide naturel ou synthétique purifié dont la séquence comprend au moins une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues.

5 13. Composition cosmétique selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit polypeptide est tel que défini en revendications 1 à 11.

14. Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un mélange de polypeptides issu de la protéolyse d'un polypeptide dont la séquence est représentée en tout ou partie par la
10 séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou leurs homologues et plus particulièrement dont la séquence est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

15. Procédé de traitement cosmétique destiné à lutter contre les troubles cutanés liés à un dysfonctionnement de la prolifération et/ou la différenciation cellulaire,
15 caractérisé en ce que l'on applique sur la peau, les muqueuses et/ou les fibres kératiniques une composition cosmétique comprenant au moins un polypeptide dont la séquence comprend au moins une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues.

20 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que ladite séquence est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

17. Procédé de traitement cosmétique selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce qu'il vise à traiter les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, les troubles de sébogénèse, les néoplasies et/ou les signes de vieillissement cutané.

25 18. Composition pharmaceutique comprenant dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide naturel ou synthétique purifié dont la séquence est en tout ou partie constituée par au moins une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues.

30 19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18, caractérisée en ce que ledit polypeptide est tel que défini en revendications 1 à 11.

20. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend dans un

milieu physiologiquement acceptable, au moins un mélange de polypeptides issu de la protéolyse d'un polypeptide dont la séquence est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou leurs homologues et plus particulièrement dont la séquence est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

21. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues et plus particulièrement est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou d'un mélange issu de la protéolyse de l'un de ces polypeptides pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des infections dermatologiques.

22. Utilisation selon la revendication 21, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est destinée à traiter l'ichtyose, le psoriasis, l'eczéma, la rosacée, les lichens, les prurits, ou toutes pathologies impliquant une hyperkératose, une parakératose, ou ayant une composante inflammatoire.

23. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues pour la préparation d'une composition antivirale.

24. Utilisation selon la revendication 23, caractérisée en ce que la séquence est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

25. Utilisation d'un composé chimique ou biologique pour la préparation d'une composition destinée à interagir avec ou à moduler l'activité biologique d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues et plus particulièrement dont la séquence est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

26. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que le composé est une protéase présentant un site spécifique de reconnaissance et/ou de fixation et de coupure au sein de la séquence dudit polypeptide.

27. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que le composé est un inhibiteur choisi de préférence parmi les inhibiteurs de rétropepsines.

28. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que le composé est un activateur.

5 29. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que le composé est un anticorps spécifique d'un polypeptide tel que défini en revendications 1 à 11.

30. Utilisation d'un composé biologique ou chimique pour la préparation d'une composition destinée à inhiber la dimérisation d'un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

10 31. Utilisation d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues à titre d'outil de diagnostic ou de criblage.

15 32. Utilisation d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues et plus particulièrement d'un polypeptide dont la séquence est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer ou purifier, 20 éventuellement à partir d'épiderme, toute molécule, susceptible de moduler son interaction avec d'éventuels ligands.

25 33. Utilisation d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues et plus particulièrement d'un polypeptide dont la séquence est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour sélectionner de nouvelles molécules antivirales présentant moins d'effets secondaires.

30 34. Utilisation d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 et leurs homologues et plus particulièrement d'un polypeptide dont la séquence est représentée par la séquence

SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer des antisérums et/ou des anticorps monoclonaux spécifiques, visant notamment à purifier ces protéines et leurs fragments ou à moduler leur activité.

5 35. Anticorps poly- ou mono-clonal, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement un polypeptide dont la séquence peptidique est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou leurs homologues et plus particulièrement qui est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

10 36. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 35 pour le diagnostic d'une déficience ou d'une surexpression de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

37. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 35 pour bloquer l'activité et/ou l'activation de la SASPase dans le traitement de pathologies caractérisées par une surexpression et/ou une activité exagérée de la SASPase.

15 38. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié codant un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11.

39. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié comprenant au moins la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 16.

20 40. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié constitué de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

41. Vecteur d'expression recombinant contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

25 42. Utilisation d'au moins une séquence d'acide désoxyribonucléique telle que définie en revendications 38 à 40 pour préparer une séquence d'acide ribonucléique sens, antisens ou antisens interférentiel.

43. Acide ribonucléique, sens, antisens ou antisens interférentiel correspondant au moins à la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

30 44. Utilisation d'au moins une séquence sens ou antisens telle que définie en revendication 43 à des fins de clonage, d'identification ou de diagnostic d'un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 ou leurs homologues.

SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer des antisérums et/ou des anticorps monoclonaux spécifiques, visant notamment à purifier ces protéines et leurs fragments ou à moduler leur activité.

35. Anticorps poly- ou mono-clonal, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement un polypeptide dont la séquence peptidique est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 ou leurs homologues et plus particulièrement qui est représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16.

36. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 35 pour le diagnostic d'une déficience ou d'une surexpression de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

37. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 35 pour bloquer l'activité et/ou l'activation de la SASPase dans le traitement de pathologies caractérisées par une surexpression et/ou une activité exagérée de la SASPase.

38. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié codant un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11.

39. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié comprenant au moins la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 24.

40. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié constitué de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

41. Vecteur d'expression recombinant contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

42. Utilisation d'au moins une séquence d'acide désoxyribonucléique telle que définie en revendications 38 à 40 pour préparer une séquence d'acide ribonucléique sens, antisens ou antisens interférentiel.

43. Acide ribonucléique, sens, antisens ou antisens interférentiel correspondant au moins à la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20 ou SEQ ID NO : 24.

44. Utilisation d'au moins une séquence sens ou antisens telle que définie en revendication 43 à des fins de clonage, d'identification ou de diagnostic d'un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 16 ou leurs homologues.

45. Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend dans un milieu physiologiquement acceptable au moins une séquence nucléotidique telle que définie dans les revendications 38 à 40 ou une séquence sens, antisens ou antisens interférentiel selon la revendication 43.

- 5 46. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend dans un milieu physiologiquement acceptable au moins une séquence nucléotidique telle que définie dans les revendications 38 à 40 ou une séquence sens, antisens ou antisens interférentiel selon la revendication 43.

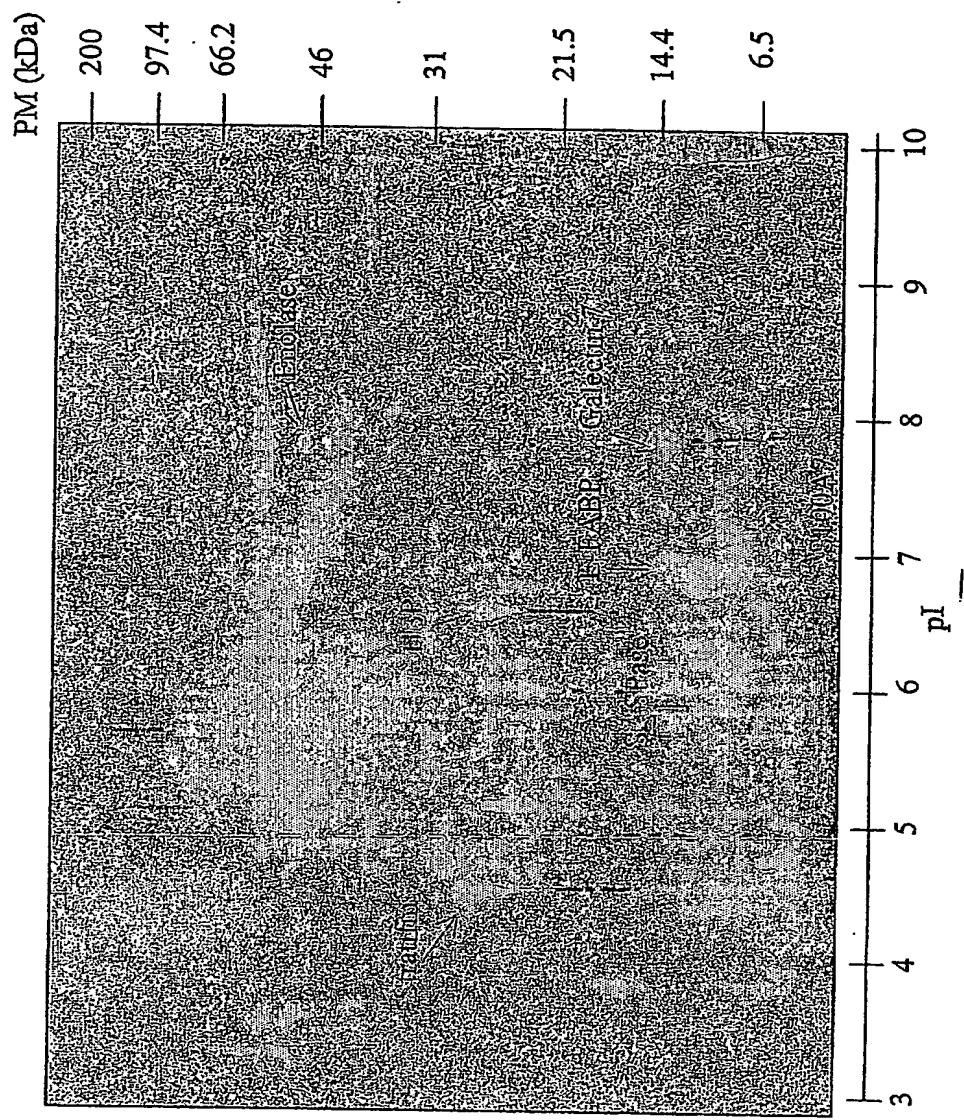


Figure 1

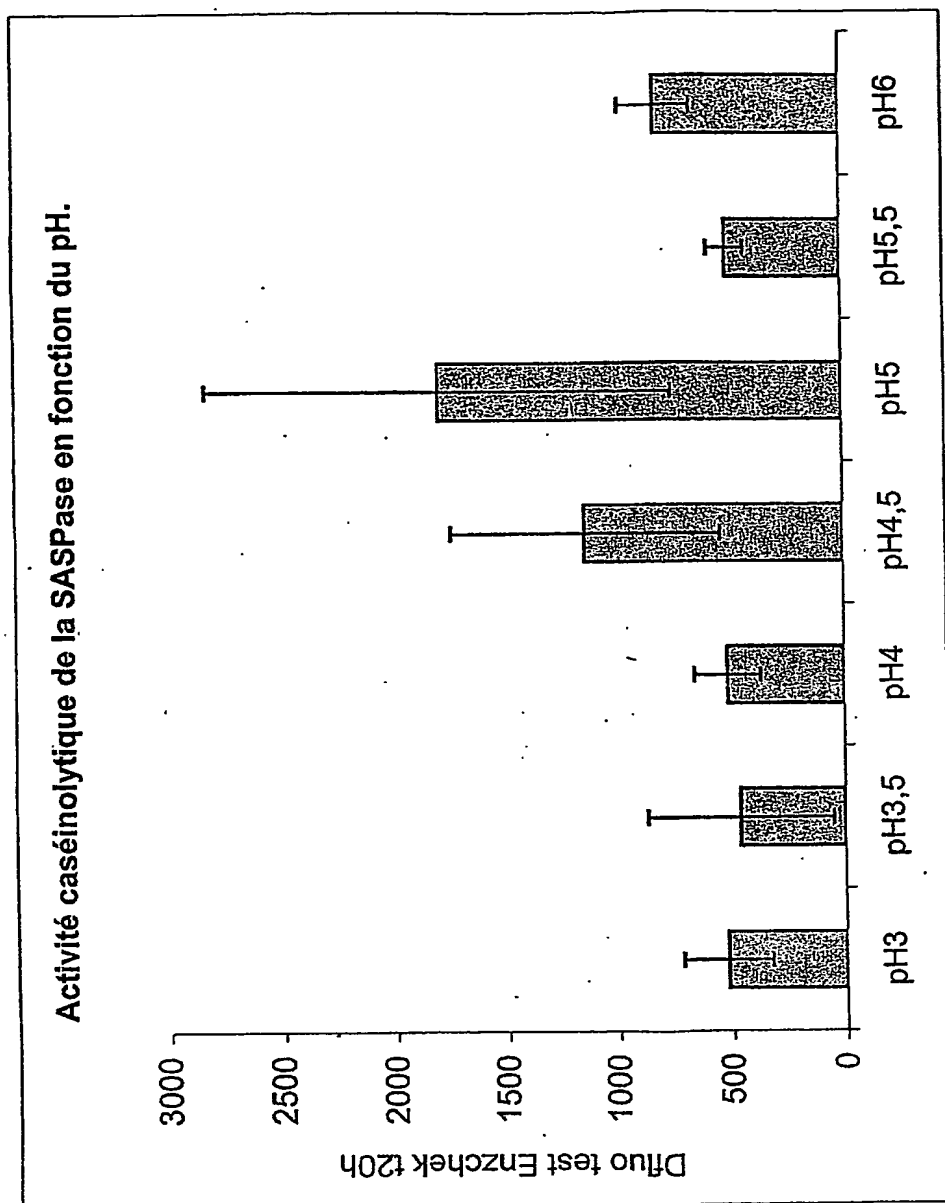


Figure 2

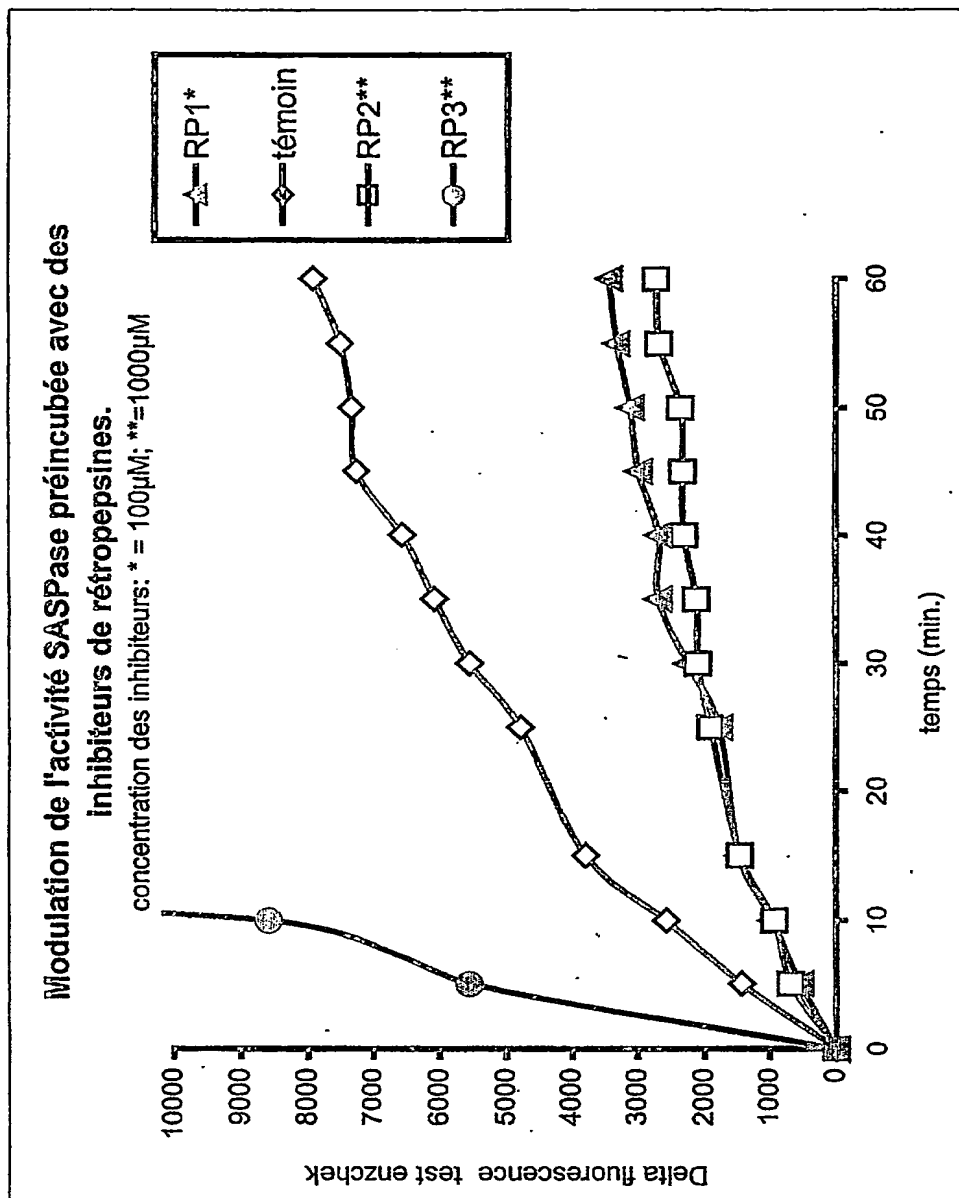


Figure 3

```

FIAV IGFVYNKVGT TTTLEKRPEILIFVNGYPIKFLDGTGADITILNRRDFQVKN-----SIE 55
HIV2 -----PQFSLWKRPVVTAYIEGQPVVLLDTCADDSIVAG--IEIGN-----NYS 43
SASPase -----ANSMGKGYYLKGKIGKVPVRFVLVDSGAQVSVVHPNLWEEVTDGDLDTLQ 49
      :: * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

FIAV NGRQNMIG-VGGGKRGTNYINVHLEIRDENYKTQCIFGNVCVLEDNSLIQPLLRDNMIK 114
HIV2 ---PKIVGGIGGFINTKEYKNVEIEVLNKKVRATIMTG-----DTPIN-IFGRNILTA 92
SASPase PFENVVKVANGAEMKILGVWDTAVSLGKLLKKAQFLVAN-----ASAEAAIIGTDVLQD 103
      : * . . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :

FIAV ENIRLVMAQ-----123
HIV2 LGMSLNL-----99
SASPase HNAILDFEHRTCTLKGKKFRLLPVGGSLEDEFDLE 138
      * :

```

Figure 4

SEQ ID N°5

M	G	S	P	G	A	S	L	G	I	K	K	A	L	Q	S	E	Q	18
ATG	GGG	AGC	CCA	GGG	GCC	AGC	CTA	GGC	ATC	AAA	AAG	GCT	CTG	CAG	AGT	GAA	CAG	54
A	T	A	L	P	A	S	A	P	A	V	S	Q	P	T	A	P	A	36
GCC	ACA	GCA	CTG	CCT	GCC	TCT	GCC	CCA	GCA	GTC	AGC	CAG	CCG	ACC	GCG	CCT	GCT	108
P	S	C	L	P	K	A	G	Q	V	I	P	T	L	L	R	E	A	54
CCC	TCC	TGC	TTG	CCC	AAG	GCC	GGA	CAA	GTC	ATC	CCC	ACT	CTG	CTT	CGA	GAG	GCC	162
P	F	S	S	V	I	A	P	T	L	L	C	G	F	L	F	L	A	72
CCG	TTT	TCC	AGC	GTG	ATT	GCG	CCG	ACA	CTG	CTC	TGT	GGG	TTT	CTC	TTC	TTG	GCG	216
W	V	A	A	E	V	P	E	E	S	S	R	M	A	G	S	G	A	90
TGG	GTT	GCT	GCT	GAG	GTT	CCA	GAG	GAG	AGC	AGC	AGG	ATG	GCC	GGG	AGC	GGA	GCC	270
R	S	E	E	G	R	R	Q	H	A	F	V	P	E	P	F	D	G	108
AGG	AGT	GAG	GAA	GGC	CGC	CGG	CAG	CAT	GCC	TTC	GTC	CCG	GAA	CCT	TTT	GAT	GGG	324
A	N	V	V	P	N	L	W	L	H	S	F	E	V	I	N	D	L	126
GCC	AAT	GTC	GTC	CCA	AAC	CTC	TGG	CTG	CAC	AGC	TTT	GAA	GTC	ATC	AAT	GAC	CTC	378
N	H	W	D	H	I	T	K	L	R	F	L	K	E	S	L	R	G	144
AAC	CAT	TGG	GAC	CAT	ATC	ACC	AAG	CTA	AGG	TTC	CTG	AAA	GAG	TCC	CTC	AGA	GGA	432
E	A	L	G	V	Y	N	R	L	S	P	Q	D	Q	G	D	Y	G	162
GAG	GCC	CTG	GGT	GTC	TAC	AAT	AGG	CTC	AGT	CCC	CAG	GAC	CAG	GGA	GAC	TAT	GGG	486
T	V	K	E	A	L	L	K	A	F	G	V	P	G	A	A	P	S	180
ACT	GTG	AAA	GAG	GCC	CTC	CTG	AAG	GCC	TTT	GGG	GTC	CCT	GGG	GCT	GCC	CCC	AGC	540
H	L	P	K	E	I	V	F	A	N	S	M	G	K	G	Y	Y	L	198
CAC	CTG	CCC	AAA	GAG	ATC	GTC	TTT	GCC	AAC	AGC	ATG	GGT	AAG	GGC	TAC	TAT	CTC	594
K	G	K	I	G	K	V	P	V	R	F	L	V	D	S	G	A	Q	216
AAG	GGG	AAG	ATT	GGC	AAA	GTG	CCC	GTG	AGG	TTC	CTG	GTG	GAC	TCT	GGG	GCC	CAG	648
V	S	V	V	H	P	N	L	W	E	E	V	T	D	G	D	L	D	234
GTC	TCT	GTG	GTC	CAC	CCA	AAC	TTG	TGG	GAG	GAG	GTC	ACT	GAT	GGC	GAT	CTG	GAC	702
T	L	Q	P	F	E	N	V	V	K	V	A	N	G	A	E	M	K	252
ACC	CTG	CAG	CCC	TTT	GAG	AAT	GTG	GTA	AAG	GTG	GCC	AAT	GGT	GCT	GAA	ATG	AAG	756
I	L	G	V	W	D	T	A	V	S	L	G	K	L	K	L	K	A	270
ATC	CTG	GGT	GTC	TGG	GAT	ACA	GCG	GTG	TCC	CTA	GGC	AAG	CTG	AAG	CTG	AAG	GCA	810
Q	F	L	V	A	N	A	S	A	E	E	A	I	I	G	T	D	V	288
CAG	TTC	CTA	GTG	GCC	AAT	GCG	AGT	GCC	GAG	GAA	GCC	ATC	ATT	GGC	ACT	GAT	GTG	864
L	Q	D	H	N	A	I	L	D	F	E	H	R	T	C	T	L	K	306
CTC	CAG	GAC	CAC	AAT	GCT	ATC	CTG	GAC	TTT	GAG	CAC	CGC	ACA	TGC	ACC	CTG	AAA	918
G	K	K	F	R	L	L	P	V	G	G	S	L	E	D	E	F	D	324
GGG	AAG	AAG	TTT	CGC	CTT	CTG	CCT	GTG	GGA	GGG	TCC	CTG	GAA	GAT	GAG	TTT	GAC	972
L	E	L	I	E	E	D	P	S	S	E	E	G	R	Q	E	L	S	342
CTG	GAG	CTC	ATA	GAG	GAG	GAC	CCC	TCC	TCA	GAA	GAA	GGG	CGG	CAG	GAG	CTA	TCC	1026
H																		343
CAC																		1029

Figure 5

SEQ ID N°7

M	G	S	P	G	A	S	L	G	I	K	K	A	L	Q	S	E	Q	18
ATG	GGG	AGC	CCA	GGG	GCC	AGC	CTA	GGC	ATC	AAA	AAG	GCT	CTG	CAG	AGT	GAA	CAG	54
A	T	A	L	P	A	S	A	P	A	V	S	Q	P	T	A	P	A	36
GCC	ACA	GCA	CTG	CCT	GCC	TCT	GCC	CCA	GCA	GTC	AGC	CAG	CCG	ACC	GCG	CCT	GCT	108
P	S	C	L	P	K	A	G	Q	V	I	P	T	L	L	R	E	A	54
CCC	TCC	TGC	TTG	CCC	AAG	GCC	GGA	CAA	GTC	ATC	CCC	ACT	CTG	CTT	CGA	GAG	GCC	162
P	F	S	S															58
CCG	TTT	TCC	AGC															174

SEQ ID N°4

M	A	G	S	G	A	R	S	E	E	G	R	R	Q	H	A	F	V	18
ATG	GCC	GGG	AGC	GGA	GCC	AGG	AGT	GAG	GAA	GGC	CGC	CGG	CAG	CAT	GCC	TTC	GTC	54
P	E	P	F	D	G	A	N	V	V	P	N	L	W	L	H	S	F	36
CCG	GAA	CCT	TTT	GAT	GGG	GCC	AAT	GTC	GTC	CCA	AAC	CTC	TGG	CTG	CAC	AGC	TTT	108
E	V	I	N	D	L	N	H	W	D	H	I	T	K	L	R	F	L	54
GAA	GTC	ATC	AAT	GAC	CTC	AAC	CAT	TGG	GAC	CAT	ATC	ACC	AAG	CTA	AGG	TTC	CTG	162
K	E	S	L	R	G	E	A	L	G	V	Y	N	R	L	S	P	Q	72
AAA	GAG	TCC	CTC	AGA	GGA	GAG	GCC	CTG	GGT	GTC	TAC	AAT	AGG	CTC	AGT	CCC	CAG	216
D	Q	G	D	Y	G	T	V	K	E	A	L	L	K	A	F	G	V	90
GAC	CAG	GGA	GAC	TAT	GGG	ACT	GTG	AAA	GAG	GCC	CTC	CTG	AAG	GCC	TTT	GGG	GTC	270
P	G	A	A	P	S	H	L	P	K	E	I	V	F	A	N	S	M	108
CCT	GGG	GCT	GCC	CCC	AGC	CAC	CTG	CCC	AAA	GAG	ATC	GTC	TTT	GCC	AAC	AGC	ATG	324
G	K	G	Y	Y	L	K	G	K	I	G	K	V	P	V	R	F	L	126
GGT	AAG	GGC	TAC	TAT	CTC	AAG	GGG	AAG	ATT	GGC	AAA	GTG	CCC	GTG	AGG	TTC	CTG	378
V	D	S	G	A	Q	V	S	V	V	H	P	N	L	W	E	E	V	144
GTG	GAC	TCT	GGG	GCC	CAG	GTC	TCT	GTG	GTC	CAC	CCA	AAC	TTG	TGG	GAG	GAG	GTC	432
T	D	G	D	L	D	T	L	Q	P	F	E	N	V	V	K	V	A	162
ACT	GAT	GGC	GAT	CTG	GAC	ACC	CTG	CAG	CCC	TTT	GAG	AAT	GTG	GTA	AAG	GTG	GCC	486
N	G	A	E	M	K	I	L	G	V	W	D	T	A	V	S	L	G	180
AAT	GGT	GCT	GAA	ATG	AAG	ATC	CTG	GGT	GTC	TGG	GAT	ACA	GCG	GTG	TCC	CTA	GGC	540
K	L	K	L	K	A	Q	F	L	V	A	N	A	S	A	E	E	A	198
AAG	CTG	AAG	CTG	AAG	GCA	CAG	TTC	CTA	GTG	GCC	AAT	GCG	AGT	GCC	GAG	GAA	GCC	594
I	I	G	T	D	V	L	Q	D	H	N	A	I	L	D	F	E	H	216
ATC	ATT	GGC	ACT	GAT	GTG	CTC	CAG	GAC	CAC	AAT	GCT	ATC	CTG	GAC	TTT	GAG	CAC	648
R	T	C	T	L	K	G	K	K	F	R	L	L	P	V	G	G	S	234
CGC	ACA	TGC	ACC	CTG	AAA	GGG	AAG	AAG	TTT	CGC	CTT	CTG	CCT	GTG	GGA	GGG	TCC	702
L	E	D	E	F	D	L	E	L	I	E	E	D	P	S	S	E	E	252
CTG	GAA	GAT	GAG	TTT	GAC	CTG	GAG	CTC	ATA	GAG	GAG	GAC	CCC	TCC	TCA	GAA	GAA	756
G	R	Q	E	L	S	H												259
GGG	CGG	CAG	GAG	CTA	TCC	CAC												777

Figure 6

SEQ ID N°8

V	I	A	P	T	L	L	C	G	F	L	F	L	A	W	V	A	A	18
GTG	ATT	GCG	CCG	ACA	CTG	CTC	TGT	GGG	TTT	CTC	TTC	TTG	GCG	TGG	GTT	GCT	GCT	54

SEQ ID N°1

F	L	V	D	S	G	A	Q	V	S	V	V	12
TTC	CTG	GTG	GAC	TCT	GGG	GCC	CAG	GTC	TCT	GTG	GTC	36

SEQ ID N°9

L	I	E	E	D	P	S	S	E	E	G	R	Q	E	L	S	H	17
CTC	ATA	GAG	GAG	GAC	CCC	TCC	TCA	GAA	GAA	GGG	CGG	CAG	GAG	CTA	TCC	CAC	51

SEQ ID N°6

A	N	S	M	G	K	G	Y	Y	L	K	G	K	I	G	K	V	P	18
GCC	AAC	AGC	ATG	GGT	AAG	GGC	TAC	TAT	CTC	AAG	GGG	AAG	ATT	GGC	AAA	GTG	CCC	54
V	R	F	L	V	D	S	G	A	Q	V	S	V	V	H	P	N	L	36
GTG	AGG	TTC	CTG	GTG	GAC	TCT	GGG	GCC	CAG	GTC	TCT	GTG	GTC	CAC	CCA	AAC	TTG	108
W	E	E	V	T	D	G	D	L	D	T	L	Q	P	F	E	N	V	54
TGG	GAG	GAG	GTC	ACT	GAT	GGC	GAT	CTG	GAC	ACC	CTG	CAG	CCC	TTT	GAG	AAT	GTG	162
V	K	V	A	N	G	A	E	M	K	I	L	G	V	W	D	T	A	72
GTA	AAG	GTG	GCC	AAT	GGT	GCT	GAA	ATG	AAG	ATC	CTG	GGT	GTC	TGG	GAT	ACA	GCG	216
V	S	L	G	K	L	K	L	K	A	Q	F	L	V	A	N	A	S	90
GTG	TCC	CTA	GGC	AAG	CTG	AAG	CTG	AAG	GCA	CAG	TTC	CTA	GTG	GCC	AAT	GCG	AGT	270
A	E	E	A	I	I	G	T	D	V	L	Q	D	H	N	A	I	L	108
GCC	GAG	GAA	GCC	ATC	ATT	GGC	ACT	GAT	GTG	CTC	CAG	GAC	CAC	AAT	GCT	ATC	CTG	324
D	F	E	H	R	T	C	T	L	K	G	K	K	F	R	L	L	P	126
GAC	TTT	GAG	CAC	CGC	ACA	TGC	ACC	CTG	AAA	GGG	AAG	AAG	TTT	CGC	CTT	CTG	CCT	378
V	G	G	S	L	E	D	E	F	D	L	E	138						
GTG	GGA	GGG	TCC	CTG	GAA	GAT	GAG	TTT	GAC	CTG	GAG	414						

SEQ ID N° 16

S	M	G	K	G	Y	Y	L	K	G	K	I	G	K	V	P		16
AGC	ATG	GGT	AAG	GGC	TAC	TAT	CTC	AAG	GGG	AAG	ATT	GGC	AAA	GTG	CCC		48
V	R	F	L	V	D	S	G	A	Q	V	S	V	V	H	P	N	36
GTG	AGG	TTC	CTG	GTG	GAC	TCT	GGG	GCC	CAG	GTC	TCT	GTG	GTC	CAC	CCA	AAC	102
W	E	E	V	T	D	G	D	L	D	T	L	Q	P	F	E	N	52
TGG	GAG	GAG	GTC	ACT	GAT	GGC	GAT	CTG	GAC	ACC	CTG	CAG	CCC	TTT	GAG	AAT	156
V	K	V	A	N	G	A	E	M	K	I	L	G	V	W	D	T	70
GTA	AAG	GTG	GCC	AAT	GGT	GCT	GAA	ATG	AAG	ATC	CTG	GGT	GTC	TGG	GAT	ACA	212
V	S	L	G	K	L	K	L	K	A	Q	F	L	V	A	N	A	88
GTG	TCC	CTA	GGC	AAG	CTG	AAG	CTG	AAG	GCA	CAG	TTC	CTA	GTG	GCC	AAT	GCG	264
A	E	E	A	I	I	G	T	D	V	L	Q	D	H	N	A	I	106
GCC	GAG	GAA	GCC	ATC	ATT	GGC	ACT	GAT	GTG	CTC	CAG	GAC	CAC	AAT	GCT	ATC	318
D	F	E	H	R	T	C	T	L	K	G	K	K	F	R	L	L	124
GAC	TTT	GAG	CAC	CGC	ACA	TGC	ACC	CTG	AAA	GGG	AAG	AAG	TTT	CGC	CTT	CTG	372
V	G	G	S	L	E	D	E	F	D	L	E						136
GTG	GGA	GGG	TCC	CTG	GAA	GAT	GAG	TTT	GAC	CTG	GAG						408

Figure 2.

SEQUENCE LISTING

<110> L'OREAL

<120> Nouvelle protéase aspartique dite SASPase et son utilisation dans le domaine cosmétique et thérapeutique.

<130> BR35246/CR/PLC/klp

<140> 02 08613

<141> 2002-07-09

<160> 24

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val
1 5 10

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly
1 5 10 15

Thr Asp Val Leu Gln
20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala Val
1 5

<210> 4

<211> 259

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 4

Met Ala Gly Ser Gly Ala Arg Ser Glu Glu Gly Arg Arg Gln His Ala
 1 5 10 15

Phe Val Pro Glu Pro Phe Asp Gly Ala Asn Val Val Pro Asn Leu Trp
 20 25 30

Leu His Ser Phe Glu Val Ile Asn Asp Leu Asn His Trp Asp His Ile
 35 40 45

Thr Lys Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ser Leu Arg Gly Glu Ala Leu Gly
 50 55 60

Val Tyr Asn Arg Leu Ser Pro Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Gly Thr Val
 65 70 75 80

Lys Glu Ala Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly Ala Ala Pro Ser
 85 90 95

His Leu Pro Lys Glu Ile Val Phe Ala Asn Ser Met Gly Lys Gly Tyr
 100 105 110

Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp
 115 120 125

Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val
 130 135 140

Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys
 145 150 155 160

Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala
 165 170 175

Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn
 180 185 190

Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His
 195 200 205

Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys
 210 215 220

Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp
 225 230 235 240

Leu Glu Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gly Arg Gln Glu
 245 250 255

Leu Ser His

<210> 5

<211> 343

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 5

Met Gly Ser Pro Gly Ala Ser Leu Gly Ile Lys Lys Ala Leu Gln Ser
1 5 10 15

Glu Gln Ala Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Val Ser Gln Pro
20 25 30

Thr Ala Pro Ala Pro Ser Cys Leu Pro Lys Ala Gly Gln Val Ile Pro
35 40 45

Thr Leu Leu Arg Glu Ala Pro Phe Ser Ser Val Ile Ala Pro Thr Leu
50 55 60

Leu Cys Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Val Ala Ala Glu Val Pro Glu
65 70 75 80

Glu Ser Ser Arg Met Ala Gly Ser Gly Ala Arg Ser Glu Glu Gly Arg
85 90 95

Arg Gln His Ala Phe Val Pro Glu Pro Phe Asp Gly Ala Asn Val Val
100 105 110

Pro Asn Leu Trp Leu His Ser Phe Glu Val Ile Asn Asp Leu Asn His
115 120 125

Trp Asp His Ile Thr Lys Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ser Leu Arg Gly
130 135 140

Glu Ala Leu Gly Val Tyr Asn Arg Leu Ser Pro Gln Asp Gln Gly Asp
145 150 155 160

Tyr Gly Thr Val Lys Glu Ala Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly
165 170 175

Ala Ala Pro Ser His Leu Pro Lys Glu Ile Val Phe Ala Asn Ser Met
180 185 190

Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro Val Arg
195 200 205

Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro Asn Leu
210 215 220

Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro Phe Glu
225 230 235 240

Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu Gly Val
245 250 255

Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala Gln Phe
260 265 270

Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr Asp Val
275 280 285

Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr Cys Thr
290 295 300

Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser Leu Glu
305 310 315 320

Asp Glu Phe Asp Leu Glu Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu
325 330 335

Gly Arg Gln Glu Leu Ser His
340

<210> 6

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 6

Ala Asn Ser Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys
1 5 10 15

Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val
20 25 30

His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu
35 40 45

Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys
50 55 60

Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu
65 70 75 80

Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile
85 90 95

Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His
100 105 110

Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly
115 120 125

Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu
130 135

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 7

Met Gly Ser Pro Gly Ala Ser Leu Gly Ile Lys Lys Ala Leu Gln Ser
1 5 10 15

Glu Gln Ala Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Val Ser Gln Pro
20 25 30

Thr Ala Pro Ala Pro Ser Cys Leu Pro Lys Ala Gly Gln Val Ile Pro
35 40 45

Thr Leu Leu Arg Glu Ala Pro Phe Ser Ser
50 55

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 8

Val Ile Ala Pro Thr Leu Leu Cys Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Val
1 5 10 15

Ala Ala

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 9

Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gly Arg Gln Glu Leu Ser
1 5 10 15

His

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce SC140 d'amplification par PCR de fragments d'ADNc codant pour la SASPase complète.

<400> 10
taggatccat ggggagccca ggggc

25

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce SC131 d'amplification par PCR d'ADNc codant pour la SASPase complète ou pour la forme tronquée SASPase Delta 1-84.

<400> 11
ttgaattctc agtgggatag ctctgcccgc

30

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce SC130 d'amplification par PCR d'ADNc codant pour la SASPase dite Delta 1-84.

<400> 12
gataggatcc atggccggga gcggagccag gag

33

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce SC134 d'amplification par RT-PCR.

<400> 13
ggccctgggt gtctacaata

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce SC135 d'amplification par RT-PCR.

<400> 14

ttggccacct ttaccacatt

20

<210> 15

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 15

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
20 25

<210> 16

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 16

Ser Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro
1 5 10 15

Val Arg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro
20 25 30

Asn Leu Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro
35 40 45

Phe Glu Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu
50 55 60

Gly Val Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala
65 70 75 80

Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr
85 90 95

Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr
100 105 110

Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser
115 120 125

Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu
130 135

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(36)

<223>

<400> 17
ttc ctg gtg gac tct ggg gcc cag gtc tct gtg gtc 36
Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val
1 5 10

<210> 18

<211> 777

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 18
atg gcc ggg agc gga gcc agg agt gag gaa ggc cgc cgg cag cat gcc 48
Met Ala Gly Ser Gly Ala Arg Ser Glu Glu Gly Arg Arg Gln His Ala
1 5 10 15

ttc gtc ccg gaa cct ttt gat ggg gcc aat gtc gtc cca aac ctc tgg 96
Phe Val Pro Glu Pro Phe Asp Gly Ala Asn Val Val Pro Asn Leu Trp
20 25 30

ctg cac agc ttt gaa gtc atc aat gac ctc aac cat tgg gac cat atc 144
Leu His Ser Phe Glu Val Ile Asn Asp Leu Asn His Trp Asp His Ile
35 40 45

acc aag cta agg ttc ctg aaa gag tcc ctc aga gga gag gcc ctg ggt 192
Thr Lys Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ser Leu Arg Gly Glu Ala Leu Gly
50 55 60

gtc tac aat agg ctc agt ccc cag gac cag gga gac tat ggg act gtg 240
Val Tyr Asn Arg Leu Ser Pro Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Gly Thr Val
65 70 75 80

aaa gag gcc ctc ctg aag gcc ttt ggg gtc cct ggg gct gcc ccc agc 288
Lys Glu Ala Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly Ala Ala Pro Ser
85 90 95

cac ctg ccc aaa gag atc gtc ttt gcc aac agc atg ggt aag ggc tac 336
His Leu Pro Lys Glu Ile Val Phe Ala Asn Ser Met Gly Lys Gly Tyr
100 105 110

tat ctc aag ggg aag att ggc aaa gtg ccc gtg agg ttc ctg gtg gac Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp 115 120 125	384
tct ggg gcc cag gtc tct gtg gtc cac cca aac ttg tgg gag gag gtc Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val 130 135 140	432
act gat ggc gat ctg gac acc ctg cag ccc ttt gag aat gtg gta aag Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys 145 150 155 160	480
gtg gcc aat ggt gct gaa atg aag atc ctg ggt gtc tgg gat aca gcg Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala 165 170 175	528
gtg tcc cta ggc aag ctg aag ctg aag gca cag ttc cta gtg gcc aat Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn 180 185 190	576
gcg agt gcc gag gaa gcc atc att ggc act gat gtg ctc cag gac cac Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His 195 200 205	624
aat gct atc ctg gac ttt gag cac cgc aca tgc acc ctg aaa ggg aag Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys 210 215 220	672
aag ttt cgc ctt ctg cct gtg gga ggg tcc ctg gaa gat gag ttt gac Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp 225 230 235 240	720
ctg gag ctc ata gag gag gac ccc tcc tca gaa gaa ggg cgg cag gag Leu Glu Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gly Arg Gln Glu 245 250 255	768
cta tcc cac Leu Ser His	777

<210> 19
<211> 1029
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1029)
<223>

<400> 19 atg ggg agc cca ggg gcc agc cta ggc atc aaa aag gct ctg cag agt Met Gly Ser Pro Gly Ala Ser Leu Gly Ile Lys Lys Ala Leu Gln Ser 1 5 10 15	48
gaa cag gcc aca gca ctg cct gcc tct gcc cca gca gtc agc cag ccg Glu Gln Ala Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Val Ser Gln Pro 20 25 30	96
acc gcg cct gct ccc tcc tgc ttg ccc aag gcc gga caa gtc atc ccc Thr Ala Pro Ala Pro Ser Cys Leu Pro Lys Ala Gly Gln Val Ile Pro 35 40 45	144

act ctg ctt cga gag gcc ccg ttt tcc agc gtg att gcg ccg aca ctg Thr Leu Leu Arg Glu Ala Pro Phe Ser Ser Val Ile Ala Pro Thr Leu 50 55 60	192
ctc tgt ggg ttt ctc ttc ttg gcg tgg gtt gct gct gag gtt cca gag Leu Cys Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Val Ala Ala Glu Val Pro Glu 65 70 75 80	240
gag agc agc agg atg gcc ggg agc gga gcc agg agt gag gaa ggc cgc Glu Ser Ser Arg Met 85 Ala Gly Ser Gly Ala Arg Ser Glu Glu Gly Arg 90 95	288
cgg cag cat gcc ttc gtc ccg gaa cct ttt gat ggg gcc aat gtc gtc Arg Gln His Ala Phe Val Pro Glu Pro Phe Asp Gly Ala Asn Val Val 100 105 110	336
cca aac ctc tgg ctg cac agc ttt gaa gtc atc aat gac ctc aac cat Pro Asn Leu Trp Leu His Ser Phe Glu Val Ile Asn Asp Leu Asn His 115 120 125	384
tgg gac cat atc acc aag cta agg ttc ctg aaa gag tcc ctc aga gga Trp Asp His Ile Thr Lys Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ser Leu Arg Gly 130 135 140	432
gag gcc ctg ggt gtc tac aat agg ctc agt ccc cag gac cag gga gac Glu Ala Leu Gly Val Tyr Asn Arg Leu Ser Pro Gln Asp Gln Gly Asp 145 150 155 160	480
tat ggg act gtg aaa gag gcc ctc ctg aag gcc ttt ggg gtc cct ggg Tyr Gly Thr Val Lys Glu Ala Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly 165 170 175	528
gct gcc ccc agc cac ctg ccc aaa gag atc gtc ttt gcc aac agc atg Ala Ala Pro Ser His Leu Pro Lys Glu Ile Val Phe Ala Asn Ser Met 180 185 190	576
ggt aag ggc tac tat ctc aag ggg aag att ggc aaa gtg ccc gtg agg Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro Val Arg 195 200 205	624
ttc ctg gtg gac tct ggg gcc cag gtc tct gtg gtc cac cca aac ttg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro Asn Leu 210 215 220	672
tgg gag gag gtc act gat ggc gat ctg gac acc ctg cag ccc ttt gag Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro Phe Glu 225 230 235 240	720
aat gtg gta aag gtg gcc aat ggt gct gaa atg aag atc ctg ggt gtc Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu Gly Val 245 250 255	768
tgg gat aca gcg gtg tcc cta ggc aag ctg aag ctg aag gca cag ttc Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala Gln Phe 260 265 270	816
cta gtg gcc aat gcg agt gcc gag gaa gcc atc att ggc act gat gtg Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr Asp Val 275 280 285	864
ctc cag gac cac aat gct atc ctg gac ttt gag cac cgc aca tgc acc Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr Cys Thr 290 295 300	912
ctg aaa ggg aag aag ttt cgc ctt ctg cct gtg gga ggg tcc ctg gaa Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser Leu Glu 305 310 315 320	960
gat gag ttt gac ctg gag ctc ata gag gag gac ccc tcc tca gaa gaa Asp Glu Phe Asp Leu Glu Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu	1008

325	330	335	
ggg cgg cag gag cta tcc cac Gly Arg Gln Glu Leu Ser His 340			1029
<210> 20			
<311> 414			
<212> DNA			
<213> Homo Sapiens			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(414)			
<223>			
<400> 20			
gcc aac agc atg ggt aag ggc tac tat ctc aag ggg aag att ggc aaa Ala Asn Ser Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys 1 5 10 15			48
gtg ccc gtg agg ttc ctg gtg gac tct ggg gcc cag gtc tct gtg gtc Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val 20 25 30			96
cac cca aac ttg tgg gag gag gtc act gat ggc gat ctg gac acc ctg His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu 35 40 45			144
cag ccc ttt gag aat gtg gta aag gtg gcc aat ggt gct gaa atg aag Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys 50 55 60			192
atc ctg ggt gtc tgg gat aca gcg gtg tcc cta ggc aag ctg aag ctg Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu 65 70 75 80			240
aag gca cag ttc cta gtg gcc aat gcg agt gcc gag gaa gcc atc att Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile 85 90 95			288
ggc act gat gtg ctc cag gac cac aat gct atc ctg gac ttt gag cac Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His 100 105 110			336
cgc aca tgc acc ctg aaa ggg aag aag ttt cgc ctt ctg cct gtg gga Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly 115 120 125			384
ggg tcc ctg gaa gat gag ttt gac ctg gag Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu 130 135			414
<210> 21			
<211> 174			
<212> DNA			
<213> Homo Sapiens			
<220>			
<221> CDS			

<222> (1)..(174)

<223>

<400> 21

atg ggg agc cca ggg gcc agc cta ggc atc aaa aag gct ctg cag agt	48
Met Gly Ser Pro Gly Ala Ser Leu Gly Ile Lys Lys Ala Leu Gln Ser	
1 5 10 15	

gaa cag gcc aca gca ctg cct gcc tct gcc cca gca gtc agc cag ccg	96
Glu Gln Ala Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Val Ser Gln Pro	
20 25 30	

acc gcg cct gct ccc tcc tgc ttg ccc aag gcc gga caa gtc atc ccc	144
Thr Ala Pro Ala Pro Ser Cys Leu Pro Lys Ala Gly Gln Val Ile Pro	
35 40 45	

act ctg.ctt cga gag gcc ccg ttt tcc agc	174
Thr Leu Leu Arg Glu Ala Pro Phe Ser Ser	
50 55	

<210> 22

<211> 54

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(54)

<223>

<400> 22

gtg att gcg ccg aca ctg ctc tgt ggg ttt ctc ttc ttg gcg tgg gtt	48
Val Ile Ala Pro Thr Leu Leu Cys Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Val	
1 5 10 15	

gct gct	54
Ala Ala	

<210> 23

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<223>

<400> 23

ctc ata gag gag gac ccc tcc tca gaa gaa ggg cgg cag gag cta tcc	48
Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gly Arg Gln Glu Leu Ser	
1 5 10 15	

cac	51
His	

<210> 24

<211> 408

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (408)

<223>

<400> 24

agc atg ggt aag ggc tac tat ctc aag ggg aag att ggc aaa gtg ccc	48
Ser Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro	
1 5 10 15	
gtg agg ttc ctg gtg gac tct ggg gcc cag gtc tct gtg gtc cac cca	96
Val Arg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro	
20 25 30	
aac ttg tgg gag gag gtc act gat ggc gat ctg gac acc ctg cag ccc	144
Asn Leu Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro	
35 40 45	
ttt gag aat gtg gta aag gtg gcc aat ggt gct gaa atg aag atc ctg	192
Phe Glu Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu	
50 55 60	
ggg gtc tgg gat aca gcg gtg tcc cta ggc aag ctg aag ctg aag gca	240
Gly Val Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala	
65 70 75 80	
cag ttc cta gtg gcc aat gcg agt gcc gag gaa gcc atc att ggc act	288
Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr	
85 90 95	
gat gtg ctc cag gac cac aat gct atc ctg gac ttt gag cac cgc aca	336
Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr	
100 105 110	
tcg acc ctg aaa ggg aag aag ttt cgc ctt ctg cct gtg gga ggg tcc	384
Ser Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser	
115 120 125	
ctg gaa gat gag ttt gac ctg gag	408
Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu	
130 135	

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 1..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 17 / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		OA02201/S819/BR73165/CR/PLC/kdp	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0208613	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouvelle protéase aspartique dite SASPase et son utilisation dans le domaine cosmétique et thérapeutique.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : L'OREAL			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		BERNARD	
Prénoms		Dominique	
Adresse	Rue	4 rue du Sommet des Alpes	
	Code postal et ville	75015	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MEHUL	
Prénoms		Bruno	
Adresse	Rue	2 place de La Fontaine	
	Code postal et ville	92800	VILLEJUIF
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Jean-Claude TONNELIER 92 1241 8 juillet 2002			

PCT Application
FR0302151

